

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA, DETERMINACIÓN DEL FPS E IRRITACIÓN PRIMARIA EN PIEL DE RATONES DE UNA CREMA ELABORADA CON EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE LAS SEMILLAS DE ***Bixa orellana*** (ACHIOTE).

TESIS PRESENTADA POR:

Br. GABY COLQUE ARCE
PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

ASESORA:

MCs. MAGALY VILLENA TEJADA

CO-ASESOR:

QF. EDISON FARFAN MAITA

“TESIS FINANCIADA POR LA UNSAAC”

CUSCO – 2019

DEDICATORIA

Dedico este logro al Creador de todo; a mis padres Julio y Melchora a quienes agradezco infinitamente el cariño y el apoyo que me han brindado. A mis hermanas Karen, Yuli y Mary por estar allí siempre conmigo y recordarme que la vida es mejor, cada vez mejor.

A todos mis amigos y maestros; aquellas maravillosas personas que aparecieron en el momento indicado para enseñarme que estar en este mundo es una experiencia única y de infinitas posibilidades.

Gaby Colque Arce

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por su constante manifestación de infinito amor

A mis padres Julio y Melchora, a mis hermanas Karen, Yuli y Mary quienes con su compañía, acciones, palabras de apoyo y comprensión me impulsan a seguir siempre adelante.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, a la Facultad de Ciencias de la Salud y a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por ser el centro de formación y desarrollo de futuros profesionales y a todos los docentes que contribuyen activamente en esta labor.

A la MCs. Magaly Villena por su orientación, apoyo y asesoría brindada en el desarrollo de esta tesis.

Al QF. Edison Farfan por su apoyo y consejos oportunos durante la ejecución de este trabajo.

A todos los amigos y profesionales que conocí en esta etapa tan importante, muchas gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
INTRODUCCIÓN.....	iv

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1	Planteamiento del problema.....	1
1.2	Formulación del problema	2
1.3	Objetivos	2
1.3.1	Objetivos generales	2
1.3.2	Objetivos específicos	2
1.4	Justificación e importancia	3
1.4.1	Prioridad	3
1.4.2	Conocimiento	3
1.4.3	Aplicabilidad	4
1.5	Hipótesis.....	4

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1	Visión histórica	5
2.2	Antecedentes	5
2.2.1	Antecedentes internacionales	5
2.2.2	Antecedentes nacionales.....	7
2.2.3	Antecedentes locales.....	10
2.3	Estado de la cuestión.....	11
2.4	Bases teórico científicas	12
2.4.1	Aspectos botánicos de <i>Bixa orellana</i> (achiote):	12
2.4.2	Usos tradicionales	13
2.4.3	Constituyentes químicos de la semilla.....	13
2.4.4	La radiación solar.....	18
2.5	Marco teórico conceptual	29

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Materiales	30
3.1.1	Material biológico.....	30
3.1.2	Materiales de laboratorio.....	30
3.1.3	Instrumentos y equipos	30
3.1.4	Otros.....	31
3.1.5	Solventes y reactivos	31
3.1.5.1	Para la maceración de semillas de achiote (<i>Bixa orellana</i>).....	31
3.1.5.2	Para la marcha fitoquímica.....	31
3.1.5.3	Para ensayos de irritación dérmica primaria de extracto de semillas de achiote en ratones albinos.....	32
3.1.5.4	Para la determinación de FPS	32
3.1.5.5	Para la valoración de cambios morfológicos cutáneos	32
3.1.5.6	Para la elaboración de la crema.....	32
3.1.5.7	Para la prueba de irritación dérmica de la crema en ratones albinos.....	32
3.1.6	Infraestructura	32
3.2	Metodología.....	32
3.2.1	Diseño metodológico.....	32
3.2.2	Nivel y tipo de investigación.....	33
3.2.3	Diseño experimental	33
3.2.3.1	Ensayo de irritación dérmica primaria del extracto al 96% de semillas de <i>Bixa orellana</i> (achiote) en ratones albinos	33
3.2.3.2	Capacidad fotoprotectora mediante la valoración de cambios inflamatorios.	34
3.2.3.3	Capacidad fotorreparadora mediante valoración de cambios morfológicos cutáneos	35
3.2.3.4	Determinación in vitro del factor de protección solar (FPS) de las cremas con extracto etanólico de <i>Bixa orellana</i> (achiote).	37
3.2.3.5	Análisis de características organolépticas y fisicoquímicas de la crema con extracto etanólico al 96% de <i>Bixa orellana</i> (achiote).....	40
3.2.3.6	Ensayo de irritación dérmica primaria de la crema con extracto etanólico al 96% de <i>Bixa orellana</i> (achiote)	40
3.3	Variables.....	41
3.3.1	Variable implicadas.....	41
3.3.1.1	Variable independiente	42
3.3.1.2	Variable dependientes.....	43
3.3.2	Variables no implicadas	46
3.3.2.1	Variables intervinientes	46
3.4	Criterios de selección	47

3.4.1	De la semilla de Bixa orellana (achiote)	47
3.4.2	De los animales de experimentación	47
3.5	Procedimientos de la investigación	47
3.5.1	Obtención y selección de las semillas de Bixa orellana (achiote).....	49
3.5.1.1	Recolección.....	49
3.5.1.2	Selección y secado	49
3.5.2	Determinación del porcentaje de humedad de las semillas de Bixa orellana (achiote).....	49
3.5.2.1	Porcentaje de humedad	49
3.5.3	Obtención del extracto seco etanólico semillas de achiote	49
3.5.3.1	Maceración	49
3.5.3.2	Obtención del extracto seco etanólico	49
3.5.4	Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico al 96% de las semillas de achiote.....	50
3.5.5	Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las semillas de achiote	50
3.5.6	Ensayo de irritación dérmica primaria del extracto de semillas de Bixa orellana (achiote) en ratones albinos.....	50
3.5.6.1	Método de evaluación de la irritación	50
3.5.6.2	Administración de la sustancia a ensayar	52
3.5.6.3	Remoción de la sustancia a ensayar	52
3.5.7	Incorporación del extracto etanólico al 96%, en la forma farmacéutica – crema base, a concentraciones de 1.0%, 3.0% y 5.0 % p/p y análisis de características organolépticas y fisicoquímicas.....	54
3.5.8	Determinación del factor de protección solar (FPS) de las cremas elaboradas con el extracto etanólico al 96% de semillas de Bixa orellana (achiote) y la crema patrón	55
3.5.8.1	Determinación del factor de protección solar (FPS)	55
3.5.9	Evaluación de la capacidad fotoprotectora en ratones albinos	58
3.5.9.1	Valoración de cambios inflamatorios cutáneos	58
3.5.9.2	Cambios inflamatorios cutáneos	58
3.5.10	Evaluación de la capacidad fotorreparadora en ratones albinos.....	59
3.5.10.1	Valoración de cambios morfológicos cutáneos	59
3.5.10.2	Estudio histopatológico	59
3.5.11	Ensayo de irritación dérmica primaria de una crema con extracto de semillas de Bixa orellana (achiote) en ratones albinos	60
3.5.12	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	61
3.5.13	Técnicas y análisis para el procesamiento de datos	61

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1	Resultados del porcentaje de humedad	62
4.2	Resultados del porcentaje de rendimiento con etanol al 96%	62
4.3	Resultado del análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de Bixa orellana (achiote)	63
4.4	Resultados del ensayo de irritación dérmica en ratones albinos	64
4.5	Resultados de la incorporación del extracto seco en la forma farmacéutica de crema, a las concentraciones de 1%, 3% y 5%	66
4.6	Resultados de la determinación in vitro del factor de protección solar (FPS) del producto comercial patrón	68
4.7	Resultados de la determinación in vitro del factor de protección solar (FPS) de las cremas con el extracto etanólico de Bixa orellana (achiote)	69
4.8	Resultados de la valoración de cambios inflamatorios cutáneos	72
4.9	Resultados de la valoración de cambios morfológicos cutáneos	80
4.10	Resultados del ensayo de irritación dérmica primaria en ratones albinos de la crema al 1% con extracto etanólico de semillas de achiote y la crema base.	85
CONCLUSIONES.....		140
SUGERENCIAS.....		143
BIBLIOGRAFÍA.....		144
ANEXOS.....		155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01: Bixa orellana (47)	12
Figura N° 02: Emisión solar de radiaciones electromagnéticas (70)	18
Figura N° 03: Factores que alteran la intensidad UV (74)	19
Figura N° 04: Principales regiones de la piel (77)	21
Figura N° 05: Índice ultravioleta y recomendaciones (74)	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01: Constituyentes químicos de la semilla de Bixa orellana	13
Tabla N° 02: Composición y puntuación química (CS) de los aminoácidos esenciales de la proteína aislada (IP) del residuo de semilla de achiote y comparación con los requerimientos FAO/OMS para adultos.	14
Tabla N° 03: Tipos de piel	26
Tabla N° 04: Irritación Dérmica Aguda en Ratones	51
Tabla N° 05: Clasificación de las sustancias a ensayar	52
Tabla N° 06: Categorías Tóxicas de la Irritación Dérmica	52

Tabla N° 07: Relación entre el Efecto eritemogénico (EE) versus la Intensidad de Radiación (I) conforme a la Longitud de Onda (A)	56
---	----

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema N° 01: Procedimiento de investigación	48
Esquema N° 02: Ensayo de Irritación Dérmica aguda.....	53
Esquema N° 03: Determinación del factor de protección solar (FPS).....	57
Esquema N° 04: Ensayo de la valoración de cambios inflamatorios.....	60
Esquema N° 05: Ensayo de la valoración de cambios morfológicos	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 01: Resultados del porcentaje de Humedad de las semilla Bixa orellana (Achiote) en Etanol al 96%.....	62
Cuadro N° 02: Resultados del Porcentaje de Rendimiento de la semilla de Bixa orellana (Achiote) en Etanol 96%.....	62
Cuadro N° 03: Resultados del análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico al 96% de la semilla de Bixa orellana (Achiote).	63
Cuadro N° 04: Resultado del ensayo de irritación dérmica aguda del extracto al 96% de Bixa orellana (Achiote)	64
Cuadro N° 05: Determinación del índice de irritación primaria (PII) a través del test de Draize.	65
Cuadro N° 06: Resultado del análisis organoléptico y fisicoquímico	66
Cuadro N° 07: Resultado de las Absorbancias del Producto Comercial.....	68
Cuadro N° 08: Factor de Protección Solar del Producto Patrón	68
Cuadro N° 09: Resultados de las Absorbancias en las formulaciones al 1.0 ,3.0 y 5.0 % de las cremas con el extracto etanólico de Bixa orellana (Achiote).....	69
Cuadro N° 10: Obtención del factor de protección solar de las cremas con el extracto etanólico de Bixa orellana (Achiote)	69
Cuadro N° 11: Resultado del cálculo del FPS de las cremas con el extracto etanólico de Bixa orellana (Achiote)	69
Cuadro N° 12: Análisis de regresión lineal general para el cálculo del FPS de las cremas elaboradas con el extracto etanólico de Bixa orellana . Resumen de modelo y estimaciones de parámetro.	70
Cuadro N° 13: Resultados de la valoración de cambios inflamatorios cutáneos	72
Cuadro N° 14: Análisis Estadístico de la Valoración de Edema y Eritema respecto a la Concentración del Extracto Etanólico de Bixa orellana (Achiote) en la Crema Base, crema patrón y controles y Diferencias de Medias según Concentración.	73
Cuadro N° 15: Prueba de análisis de varianza (ANOVA).	73
Cuadro N° 16: Eritema –HSD de Tukey	74
Cuadro N° 17: Edema – HSD de Tukey	75
Cuadro N° 18: Análisis Estadístico de la Valoración de edema y eritema respecto al Tiempo del Extracto de Bixa orellana (Achiote) en la Crema Base – Contraste de Levene y Diferencias de Medias según el Tiempo	76

Cuadro N° 19: Prueba de análisis de varianza (ANOVA)	77
Cuadro N° 20: Eritema – HSD de Tukey	77
Cuadro N° 21: Edema – HSD de Tukey	78
Cuadro N° 22: Resultados de la valoración de cambios morfológicos cutáneos – Resultados histopatológicos	80
Cuadro N° 23: Resultado del ensayo de irritación dérmica aguda de la crema al 1% de Bixa orellana (Achiote).....	85
Cuadro N° 24: Determinación del índice de irritación primaria (PII) a través del test de Draize	86

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 01: Grafico Factor de Protección Vs Concentración de la crema	70
Gráfico N° 02 : Gráfico de Medias de la Valoración de Eritema respecto a la Concentración del Extracto etanólico de la Bixa orellana (Achiote) en la Crema.	75
Gráfico N° 03: Gráfico de Medias de la Valoración de Edema respecto a la Concentración del Extracto etanólico de la Bixa orellana (Achiote) en la Crema.	76
Gráfico N° 04: Gráfico de Medias de la Valoración de Eritema respecto al Tiempo Después de la Exposición a Radiación Ultravioleta	79
Gráfico N° 05: Gráfico de Medias de la Valoración de Edema respecto al Tiempo Después de la Exposición a Radiación Ultravioleta	79

ABREVIATURAS

RUV	Radiación ultravioleta.
FPS	Factor de protección solar.
UV/VIS	Ultravioleta visible.
OMS	Organización mundial de la salud.
IIP	Índice de irritación primaria.
VIP	Valor individual de índice de irritación primaria.
mg	Miligramo/s.
g	Gramo/s.
mL	Mililitro/s.
min	Minuto/s.
h	Hora/s.
d	día/s.

RESUMEN

En este trabajo de investigación intitulado EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA, DETERMINACIÓN DEL FPS E IRRITACIÓN PRIMARIA EN PIEL DE RATONES DE UNA CREMA ELABORADA CON EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE LAS SEMILLAS DE **Bixa orellana** (ACHIOTE), el objetivo es evaluar la capacidad fotoprotectora y fotorreparadora a través de la valoración de cambios inflamatorios y morfológicos cutáneos respectivamente; el factor de protección solar (FPS) y la irritación primaria en piel de ratones de una crema elaborada con el extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote).

Para este estudio se obtuvieron los extractos seco etanólico de semillas de **Bixa orellana** (achiote). El porcentaje de rendimiento del extracto etanólico al 96% de las semillas evaluado fue de 4.51%. En el análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote), se observó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, leucoantocianidinas y quinonas.

Para los ensayos de Irritación Dérmica Primaria en ratones albinos se utilizó el extracto etanólico de las semillas disueltas en tween 80, obteniéndose que los extractos al 1.0%, 3.0% y 5.0% pertenecen a la categoría de NO IRRITANTES. Para la determinación del factor de protección solar (FPS) la capacidad fotoprotectora y fotorreparadora (in vivo) se incorporó los extractos etanólicos secos de semillas en cremas base a las concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0 % y se procedió con el análisis de características organolépticas y fisicoquímicas.

Se realizó la determinación del FPS a las cremas; obteniéndose un FPS de 42 para la crema comercial patrón (Bahia superblock). En el caso de las cremas con en el extracto etanólico de semilla incorporado se obtuvo un FPS de 1.1 para la crema al 1.0%, un FPS de 1.2 para la crema al 3.0 % y un FPS de 1.4 para la crema al 5.0 %. A estas cremas se les realizó los ensayos de valoración de cambios inflamatorios y morfológicos como parte de las pruebas in vivo de capacidad fotoprotectora y fotorreparadora respectivamente en ratones hembra de la especie *Mus musculus*, donde se determinó el grado de eritema y edema luego de la irradiación con luz UV para los cambios inflamatorios; y se evaluó la intensidad de daño como hiperqueratosis, espongiosis, úlceras, congestión, anexos, costra e hiperplasia en la piel para cambios morfológicos. Se seleccionó la crema al 1% para la prueba de Irritación Dérmica Primaria por poseer mejor respuesta en los ensayos de capacidad fotorreparadora ya que la respuesta fue similar a las otras concentraciones en los ensayos de determinación de FPS y capacidad fotoprotectora.

Se concluye que la crema al 1.0% del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (Achiote) presenta un FPS = 1.1 valor no muy diferenciado en comparación a las otras concentraciones. El grado de eritema y edema son menores en las 3 concentraciones y la intensidad en la valoración de cambios morfológicos cutáneos es menor en la crema al 1%.

Palabras clave: **Bixa orellana**, capacidad fotoprotectora, factor de protección solar.

ABSTRACT

In this research work entitled: EVALUATION OF THE PHOTOPROTECTING CAPACITY, DETERMINATION OF SPF AND PRIMARY IRRITATION IN MICE SKIN OF A CREAM PREPARED WITH 96% ETHANOLIC EXTRACT OF THE *Bixa orellana* (ACHIOTE) SEEDS. The objective is to evaluate the photoprotective and Fotorreparadora capacity through the evaluation of skin inflammatory and morphological changes, respectively; the sun protection factor (SPF) and primary skin irritation in mice of a cream made with 96% ethanolic extract of *Bixa orellana* (achiote) seeds.

For this study, dry ethanolic extracts of *Bixa orellana* (achiote) seeds were obtained. The yield percentage of the ethanol extract at 96% of the seeds evaluated was 4.51%. In the qualitative phytochemical analysis of the 96% ethanolic extract of the seed of *Bixa orellana* (annatto), the presence of phenolic compounds, flavonoids, leucoanthocyanidins, and quinones was observed.

For tests of primary dermal irritation in albino mice, was used the ethanolic extract of the seeds dissolved in tween 80, obtained that the extracts to 1.0%, 3.0%, and 5.0% belong to the category of non-irritants. For the determination of the Solar Protection Factor (FPS), the photoprotective and photoreparative capacity (in vivo) ;the dry ethanol extracts of seeds were incorporated in base creams to the concentrations of 1.0, 3.0 and 5.0% and it proceeded with the analysis of organoleptic characteristic and physicochemical.

The determination of the SPF was realized to the creams; obtaining an SPF of 42 for the standard commercial cream (Bahia superblock). In the case of the creams with the ethanolic extract of seed incorporated, was obtained an SPF of 1.1 for the cream to 1.0%, an SPF of 1.2 for the cream to 3.0% and an SPF of 1.4 for the cream to 5.0%. These creams were tested for the assessment of inflammatory and morphological changes as part of the in vivo tests of photoprotective and photoreparative capacity respectively in female mice of the species *Mus musculus*, where the degree of erythema and edema after irradiation with UV light was determined. for inflammatory changes; and damage intensity was evaluated as hyperkeratosis, spongiosis, ulcers, congestion, appendices, crust and hyperplasia in the skin for morphological changes. The 1% cream was selected for the primary dermal irritation test because it had a better response in the photoreparative capacity tests since the response was similar to the other concentrations in the SPF determination test and photoprotective capacity.

It is concluded that the cream to 1.0% of the extract ethanolic to 96% of seeds of *Bixa Orellana* (Achiote) presents an FPS = 1.1 value not very differentiated compared to the other concentrations. The degree of erythema and edema are lower in the 3 concentrations and the intensity in the estimation of cutaneous morphological changes is lower in the cream to 1%.

Keywords: *Bixa orellana*, photoprotective capacity, sun protection factor.

INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes, el hombre ha identificado al sol como fuente de luz, calor y vida.(1) La radiación electromagnética emitida por el sol tiene diferentes repercusiones en el órgano cutáneo dependiendo del fragmento de radiación considerado (2) . Una de estas radiaciones es la ultravioleta (3) que cada día posee mayor incidencia sobre la tierra, principalmente en la zona ecuatorial y en áreas donde la capa de ozono esta reducida o deteriorada (4) (5).

La intensidad de la radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre puede ser de 2 a 6 mW/cm², siendo la proporción de rayos UVA 10-20 veces superior que la UVB. Sus efectos biológicos son muy diversos dependiendo de su longitud de onda, penetración en la piel y tiempo de exposición, pudiendo aparecer poco después de la exposición solar o años más tarde. Entre los primeros efectos destaca el eritema, la quemadura solar, la fotodermatosis y la inmunosupresión; entre los segundos, la fotocarcinogénesis y el fotoenvejecimiento. (6)

En la actualidad es indispensable la utilización de fotoprotectores cosméticos que contienen los denominados filtros solares con propiedad de reflejar, absorber o dispersar los rayos solares, de modo que permiten una exposición solar más prolongada y protegen la piel humana de los efectos nocivos del sol (5).

Sin embargo ahora existe un interés creciente en las sustancias herbarias que ofrecen protección contra los efectos dañinos de los rayos UV, debido a que pueden causar menos efectos secundarios en comparación con los protectores solares químicos y son atractivos para los pacientes que desean usar productos naturales.(7)

Dentro de varias especies vegetales registradas las semillas de ***Bixa orellana*** (Achiote) han sido utilizadas desde épocas precolombinas para pintar pieles, como ornamentación, como protección contra insectos caseros y como protector solar de la piel humana. (8)(9)(10)

Por todo ello el objetivo de este trabajo de investigación es evaluar la capacidad fotoprotectora, fotorreparadora y determinar el FPS de una crema elaborada con el extracto etanólico al 96% de ***Bixa orellana*** (achiote) para poder ofrecer a la población una alternativa más, de origen natural y así contrarrestar los daños producidos por la sobreexposición a la radiación ultravioleta.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La rutina al aire libre en diferentes tipos de actividades de la vida diaria y ocupaciones profesionales por ejemplo agricultura, construcción, minería, celebraciones, paseos, deportes y una amplia gama de eventos, permiten que personas de distintos grupos de edad se expongan a la radiación ultravioleta (UV) del sol (11). Mientras tanto, nuestra sociedad industrializada ha producido clorofluorocarbonos (CFC) que reaccionan químicamente con el ozono estratosférico que protege la Tierra de la mayoría de las longitudes de onda dañinas de la radiación ultravioleta. Por lo tanto la consiguiente pérdida de ozono estratosférico se ha relacionado con niveles crecientes de algunos tipos de radiación (12). Los aumentos en la UVR en el ambiente se asocian con un aumento de los efectos adversos para la salud debido a la excesiva exposición a la radiación UV, en ausencia de cambios de comportamiento poblacional y esfuerzos de protección solar (13) (12).

La luz solar natural que percibimos en nuestro planeta está compuesta por UVB , UVA, luz visible y luz infrarroja. De la radiación UV que recibimos, la UVB comprende aproximadamente el 5% y la UVA el 95% restante, sin embargo la luz UVB es la responsable de la mayor parte de los daños biológicos ocasionados por la luz solar (4). Se considera que la radiación UVB es la responsable del eritema inmediato, la pigmentación de la piel, la fotoinmunosupresión y el cáncer cutáneo no melanoma. En cambio, a la radiación UVA se le atribuyen efectos a largo plazo como fotosensibilización, fotoenvejecimiento y melanoma (14). Tanto las radiaciones UVA como UVB juegan un papel importante en la patogénesis de enfermedades relacionadas con el fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis (15).

El Perú es uno de los países que recibe a diario niveles de radiación ultravioleta extremos, debido al deterioro de la capa de ozono en la franja ecuatorial siendo los departamentos de Junín, Cerro de Pasco, Cusco, Arequipa, Puno, Moquegua y Tacna los mas afectados (16). Según estudios a nivel nacional se estiman que anualmente se presentan cerca de 1200 nuevos casos de cáncer de piel y más de 500 casos fallecen a causa de esta enfermedad (17), la cual ocupa el tercer lugar de neoplasias malignas, después del cáncer de cérvix y estómago (18)(19). El principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de piel sumado a la carga genética es la exposición a radiaciones no ionizantes: Como en el caso de la exposición acumulativa o intermitente a la radiación solar sin fotoprotección, esto representa un 80% del total registrado mientras que el 20% se debe a inmunodepresión (Transplante de órganos); antecedentes familiares y ocupacionales (20). En la ciudad del Cusco según las declaraciones de la dermatóloga Sindy Solórzano Gutiérrez en el 2017, de 40 casos de cáncer de piel pasaron a registrarse 70 casos anualmente en los últimos cinco años (21).

Existen muchos métodos de fotoprotección tanto físicos, inorgánicos como los químicos en cuyas investigaciones tempranas se alcanzan muchos puntos sobre los efectos perjudiciales que causan estos fotoprotectores químicos por su uso en demasía (22). Como por ejemplo se han reportado efectos irritativos del octotrileno (23), otros estudios manifiestan que la dermatitis alérgica de contacto es producida por compuestos como

octotrileno, benzofenonas, oxibenzona(24), metoxidibenzoilmetano(25) y alérgenos como el octilmetoxicinamato (26).

Por otro lado también se han registrado efectos negativos de estos filtros químicos en el medio ambiente mas específicamente por la bioacumulacion de estos compuestos en el ecosistema marino que podrían estar alterando el sistema endocrino en algunos peces (27)(28). Es así que algunas investigaciones realizadas sugieren el uso de alternativas provenientes de fuentes naturales (5). Por tal motivo, es necesaria la utilización de un fotoprotector con compuestos que no sean tóxicos y que no dañen el medio ambiente.(29)

Existe un creciente interés en las sustancias herbarias que ofrecen protección contra los efectos dañinos de los rayos UV. Las sustancias herbarias pueden actuar como adsorbentes de los rayos UV y antioxidantes que potencialmente tienen pocos efectos secundarios.(7)

En los últimos años, los estudios se han centrado considerablemente en la identificación de plantas naturales para la prevención de la fotocarcinogénesis. Una amplia variedad de compuestos botánicos, principalmente flavonoides y otras sustancias fenólicas, han reportado poseer actividades anticancerígenas y antimutagénicas sustanciales, debido a sus propiedades antioxidantes, anti inflamatorias y protectores solares o promover la reparación de moléculas como aductos de ADN(30).

El achiote, conocido también con los nombres de achote, bixa, bija, urucú, anato, onoto y otros, es un arbusto originario de América Tropical que desde tiempos inmemoriales algunas tribus aborígenes de América utilizaron sus semillas para teñir el cuero, repeler insectos y para proteger su piel de los rayos del sol. (31)(10)

Por lo que se plantea el estudio de la capacidad fotoprotectora y fotorreparadora de una crema elaborada con el extracto etanólico al 96% de las semillas de **Bixa orellana** (achiote) a la cual se le determinará el Factor de Protección Solar (FPS) así como una prueba de irritación primaria en piel de ratones.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentará capacidad fotoprotectora, fotorreparadora, valor de factor de protección solar (FPS) y ausencia de irritación primaria en piel de ratones, una crema elaborada con el extracto etanólico al 96% de las semillas de **Bixa orellana** (achiote)?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVOS GENERALES:

Evaluar la capacidad fotoprotectora, determinar el factor de protección solar (FPS) e irritación primaria en piel de ratones de una crema elaborada con el extracto etanólico al 96% de las semillas de **Bixa orellana** (achiote).

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Recolectar, seleccionar y obtener extracto etanólico de semillas de **Bixa orellana** (achiote). Determinar el porcentaje de humedad y porcentaje de rendimiento del extracto etanólico de semillas de **Bixa orellana** (achiote).

2. Efectuar el análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote), para determinar la presencia de metabolitos secundarios.
3. Realizar estudios de irritación dérmica primaria a diferentes concentraciones con el extracto etanólico de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) en ratones albinos Balb/c.
4. Incorporar en una crema base el extracto etanólico de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) a diferentes concentraciones y desarrollar el análisis de características organolépticas y fisicoquímicas.
5. Determinar la capacidad de fotoprotección de una crema a diferentes concentraciones del extracto etanólico de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote), mediante el cálculo in vitro del Factor de Protección Solar (FPS).
6. Evaluar la capacidad fotoprotectora y fotorreparadora in vivo de una crema a diferentes concentraciones del extracto etanólico de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) mediante valoración de cambios inflamatorios y morfológicos respectivamente en piel de animales de experimentación frente a radiaciones UV.
7. Evaluar la irritación dérmica primaria en piel de ratón de la crema elaborada con el extracto etanólico de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) de la concentración que mejor capacidad fotoprotectora, fotorreparadora y FPS presente.

1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

1.4.1 Prioridad

Este trabajo tiene como propósito beneficiar con la información a la población mediante la investigación y evaluación de la capacidad fotoprotectora de una crema elaborada con el extracto etanólico al 96% de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote), aprovechando los metabolitos que posee. Otra finalidad es poder revalorar el uso tradicional de esta planta para prevenir los efectos adversos de la prolongada exposición a la radiación UV, empleo derivado en la costumbre de usarlo con fines diversos relacionados con la protección de la piel(9) el que ha sido registrado por diversos autores.

1.4.2 Conocimiento

Hoy en día, en nuestra sociedad tener un aspecto bronceado es signo de salud, bienestar e incluso de buen estatus social. El ser humano tiene unos mecanismos de defensa frente a la radiación solar, pero si el tiempo de exposición al sol es excesivo estos sistemas se saturan y se producen daños tisulares y/o sistémicos a veces irreparables (14). La ciudad del Cusco alcanza índices de radiación consideradas extremas (16) a comparación de otros departamentos en el Perú, hecho que es resaltado por la dermatóloga Sendy Solórzano Gutiérrez, quien manifestó que de 40 casos de cáncer de piel pasaron a registrarse 70 anualmente, del 2012 al 2016 (32). Por esta razón, es necesario proteger nuestra piel con un fotoprotector adecuado que no causen efectos dañinos en la piel de las personas ni provoquen gran impacto ambiental(3). Las semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) presentan compuestos como la bixina, norbixina, ácido elágico, vitamina A, luteína en las semillas (33)(34) . Esta mezcla de moléculas puede absorber la luz visible y la luz UV de diferentes longitudes onda (7).

1.4.3 Aplicabilidad

Bajo la tendencia mundial de producir cosméticos a partir de materias primas naturales, esta investigación busca elaborar una crema a base de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) como alternativa de protector solar y así poder beneficiar a la población con una propuesta de producto cosméticos cuyo principal componente es un activo natural.

A su vez este trabajo de investigación contribuirá con posteriores investigaciones que también consideren otras especies vegetales con potencial capacidad fotoprotectora; así poder unir y potenciar las propiedades de diferentes especies vegetales con la finalidad de obtener productos de mayor efecto y mejores características.

1.5 HIPÓTESIS

El extracto etanólico al 96% de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) incorporado en una crema presenta capacidad fotoprotectora frente a las radiaciones UV, factor de protección solar y ausencia de irritación primaria en piel de ratones.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 VISIÓN HISTÓRICA

Los problemas como la contaminación ambiental, el calentamiento global y la reducción de la capa de ozono causado por la acción humana hace que las personas estén cada vez más implicadas con la protección de la piel, pero se engaña quien piensa que esa preocupación es reciente. Las civilizaciones antiguas ya sintieron la necesidad de protegerse contra los rayos nocivos del sol, incluso en aquellas donde el sol era el astro rey. Los médicos recomendaban la exposición a la luz solar como medio para evitar enfermedades, pero esa exposición debe ser moderada, porque el sol en exceso es perjudicial para la salud. El primer registro de protección solar comenzó con los egipcios, que utilizaron ingredientes como salvado de arroz, jazmín y lupino. Recientemente se descubrió que el salvado de arroz absorbe la luz ultravioleta, el jazmín ayuda a reparar el ADN y el altramuz aligera la piel. Otras culturas han probado suerte con la protección solar con diversos éxitos. Los antiguos griegos usaban aceite de oliva. Algunas tribus nativas americanas usaban *Tsuga canadensis*, un tipo de aguja de pino, que también era eficaz para calmar las quemaduras solares (35). El primer protector realmente eficaz fue desarrollado en 1944, por el americano Benjamin Greene. Observando las quemaduras de piel en los soldados regresados de la II Guerra Mundial, Greene decidió crear un producto que pudiera ser útil en la protección de la piel contra los rayos nocivos del sol. Ese protector solar era elaborado a base de petróleo, de color rojo y un tanto viscoso(36).

A lo largo del tiempo, el protector tuvo varias mejoras importantes, presentando diversas versiones adaptadas a diferentes tipos de piel. Actualmente, el filtro solar se ha vuelto un recurso indispensable de carácter preventivo (37).

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

- **Violante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AFS, Santos RAN, Ferrari M. Evaluación in vitro de la actividad fotoprotectora de extractos vegetales del cerrado de Mato Grosso. Brazilian J Pharmacogn. 2009; 19(2 A):452–7. (38)**

El objetivo fue estudiar el potencial fotoprotector de especies de diferentes familias (Apocynaceae, Lythraceae, Oxalidaceae) provenientes de la región de Mato Grosso. Como metodología, se midió la absorbancia de los extractos etanólicos secos diluidos en alcohol absoluto (50 mg/L y/o 100 mg/L) entre las longitudes de onda de 260 a 400nm para verificar la absorción en las regiones ultravioleta A y B (UVA y UVB). Para detectar alcaloides y polifenoles, los extractos fueron sometidos a un análisis fitoquímico cualitativo preliminar. Los extractos etanólicos secos que presentaron absorción en UVB fueron vehiculizados en una emulsión y sometidos a la prueba de determinación in vitro del Factor de Protección Solar (FPS) desarrollado por Mansur. Como resultado *M. Velame* presentó absorción en la región UVB; *L. pacari* y *O. hirsutissima* presentaron absorbancia en la región UVA. Se concluye que en la concentración utilizada y

estandarizada, ninguna de las especies presentó FPS ≥ 2 , por lo que no pueden ser consideradas plantas con potencial fotoprotector (38).

- **De Souza FP, Campos GR, Packer JF. Determinación de la actividad fotoprotectora y antioxidante en emulsiones conteniendo extracto de *Malpighia glabra* L. – Acerola. Rev Ciencias Farm. Basica e Apl. 2013; 34(1):69–77. (39)**

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro del extracto seco de acerola al 10% vehiculizada en emulsiones del tipo O / A y emulsiones añadidas con filtros solares químicos. Los ensayos físico-químicos y microbiológicos se realizaron durante la evaluación de su estabilidad. La emulsión compuesta por el extracto de acerola presentó absorción en la región UVB con absorbancia máxima en 290 nm. Como resultado se obtuvo que en la concentración utilizada, la acerola no presentó FPS ≥ 2 , pero se confirmó actividad antioxidante en la formulación. La asociación del extracto de acerola con los filtros químicos se presentó estable frente a los ensayos de estabilidad y acción sinérgica en la protección de la piel contra los daños inducidos por la radiación UV. (39)

- **De la Vega MR, Zhang DD, Wondrak GT. Bixina tópica confiere protección NRF2-Dependent contra fotodaño y canas en la piel de ratón. Front Pharmacol. 2018; 9 (MAR):1–11. (40)**

El factor de transcripción NRF2 [factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (E2)] es el regulador principal de la respuesta antioxidante celular que protege la piel de diversos factores ambientales estresantes, incluida la radiación UV y los contaminantes electrófilos. NRF2 en los queratinocitos epidérmicos se puede activar utilizando compuestos quimiopreventivos naturales como la bixina apocarotenoide, un aditivo alimentario aprobado por la FDA y un ingrediente cosmético de las semillas del árbol de achiote (*Bixa orellana*). En este estudio el objetivo fue probar la viabilidad del uso tópico de bixina para fotoprotección de piel dependiente de NRF2 en dos modelos de ratón genéticamente modificados [SKH1 y C57BL / 6J (Nrf2+/+ frente a Nrf2-/-)]. Como resultados se observó que una formulación de bixina optimizada para la activación NRF2 tópica suprime el fotodaño agudo inducido por UV en ratones Nrf2 +/+ pero no Nrf2-/- SKH1, un efecto fotoprotector indicado por hiperproliferación epidérmica reducida y daño oxidativo del ADN. En segundo lugar, se demostró que la bixina tópica suprime el encanecimiento del cabello inducido por PUVA (psoraleno C UVA) en ratones Nrf2+/+ pero no Nrf2-/- C57BL / 6J. Este estudio representa la primera evidencia in vivo de que la aplicación tópica de bixina puede proteger contra el daño solar inducido por UV y la pérdida de pigmentación del cabello inducida por PUVA a través de la activación de NRF2 esto puede representar una nueva estrategia para la fotoprotección de la piel humana, que puede complementar los enfoques convencionales basados en la protección solar (40).

- **Serafini MR, Detoni CB, Menezes PDP, Pereira Filho RN, Fortes VS, Vieira MJF, et al. Actividad fotoprotectora UVA-UVB de formulaciones tópicas que contienen extracto de *Morinda citrifolia* Mairim. Biomed Res Int. 2014; 2014. (41)**

Este estudio tiene como objetivo investigar los beneficios potenciales de la aplicación tópica de *M. citrifolia* a concentraciones del 10% y 15% en la piel dorsal de ratones expuestos a la luz UVA-UVB (lámpara Repti Glo 10.0 (Exo Terra)). Utilizando 7 días de tratamiento, [antes (valores basales) y 20 h después de la exposición UV], se evaluaron el grosor, el daño de la barrera cutánea (TEWL), el eritema y las alteraciones histológicas. Los resultados mostraron que las formulaciones que contienen el extracto protegen la piel contra el daño inducido por UV. Se concluye en que los resultados actuales sugieren fuertemente el efecto fotoprotector de *M. citrifolia*. Los resultados indican que los efectos fotoprotectores se deben no solo a la absorbancia UV, como los filtros UV, sino también a los efectos biológicos, que ocurrieron principalmente con la aplicación de la formulación que contiene el extracto de *M. citrifolia*. Se necesitan más estudios para aclarar la naturaleza precisa de este efecto fotoprotector (41).

- **Mollineda A, Rodríguez M, González KL, Valdés O, Hernández Y, Concepción ÁR, et al. Actividad fotoprotectora y fotorreparadora de los extractos de las angiospermas marinas, *Thalassia testudinum* Banks ex König (Hydrocharitaceae) y *Syringodium filiforme* Kützinger (Cymodoceaceae). Rev. Mar Cost. 2016;8 (1):51–62. (42)**

Este estudio describe el efecto tópico de los extractos de estas plantas contra el daño agudo inducido por la radiación UVB. Para la administración de los tratamientos se crearon cinco grupos experimentales. El efecto de los extractos fue evaluado in vivo, irradiando la piel de la región dorsal de ratones albinos con radiación UVB (dosis: 1.21×10^3 Jxcm²). Antes o después de la radiación UVB los animales recibieron tratamiento tópico con los extractos de ambas angiospermas a dosis de 500 µg x cm² de piel. Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los grupos *T. testudinum*, *S. filiforme*, los “irradiados” y “placebo”. Los extractos de *T. testudinum* y *S. filiforme* reducen el daño macroscópico causado por la radiación UVB en las pieles irradiadas en los modelos de tratamiento preventivo y de fotodaño. Además, mostraron un efecto protector y reparador del daño inducido por las radiaciones UVB, lo que podría estar relacionado con su actividad antioxidante (42).

2.2.2 ANTECEDENTES NACIONALES

- **Molina K M y Ávila J C. Evaluación del efecto fotoprotector de una crema a base de propóleo procedente del distrito de Lambrana-Apurimac [Tesis]. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2010. (43)**

Con la finalidad de elaborar un fotoprotector a base de propóleo este recurso natural fue recolectado en el distrito de Lambrana - Apurimac. Se obtuvo el extracto de propóleo con etanol a 70% y se prosiguió con la formulación de cremas al 5 %, 10%, 20%, 30% y 40% del extracto, los que se analizaron por el método espectrofotométrico para la

determinación del FPS en la región UVB y un ensayo biológico controlado para la región UVC utilizando ratones albinos cepa Balb/C divididos en cinco grupos e irradiados a una fuente artificial de RUV a dosis única de 23,4 J/cm², durante 30 minutos siendo evaluados por observación macroscópica durante 7 días e histopatológica del tejido sano respecto al dañado. Como resultado se obtuvo que la crema a base de propóleo presenta efecto fotoprotector demostrándose tanto para la región UVB que al 20% tiene 37.86 de FPS y según evaluación clínica se obtuvo que, con el fotoprotector a base de propóleo al 20% presento piel normal macroscópicamente y sin alteraciones microscópicas significativas, mientras que con el fotoprotector comercial presentó eritema, descamación de la piel a nivel macroscópico y alteraciones microscópicas significativas. Por lo tanto la crema de propóleo al 20% presenta alto efecto fotoprotector comparado con un fotoprotector comercial. (43)

- **Inocente MA, Tomas GE, Huaman J, Muñoz MA. Actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una loción y gel elaborados con extracto estabilizado de camu camu (*Myrciaria dubia* Kunth.). Rev Soc Quím Perú. 2014; 80 (1). (44)**

Esta investigación tuvo como finalidad evaluar la capacidad antioxidante y fotoprotectora de una loción y un gel elaborados con extracto estabilizado de los frutos de camu camu (*Myrciaria dubia* Kunth). Se realizaron los controles de calidad fisicoquímica, microbiológica y estabilidad a condiciones normales y aceleradas, lo cual permitió elaborar parámetros iniciales para los protectores solares con extracto de camu camu. Se determinaron la actividad antioxidante por el método de DPPH y ABTS, valores de 876,729 umol Trolox/g camu camu para el gel y 1389,650 umol Trolox/g camu camu para la loción (método PPH) y valores de 15,330 mmol Trolox/g camu camu para el gel y 23.384 mmol Trolox/g camu camu para la loción (método ABTS). El FPS de las formulaciones se determinó mediante un método in vitro desarrollado por Mansur. Se hallaron valores de 10.897 ± 0.298 para el gel, 13.401 ± 0.319 para la loción y un valor de 1.5 para la formulación de extracto al 15% en gel y un valor de 2.6 para la formulación de extracto al 15% en loción (44).

- **Inocente MC, Huamán JM, Palomino MP, Bonilla PR. Compuestos fenólicos, actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una crema gel elaborada con extracto estabilizado de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* HBK). Rev. Per Quím Ing Quím. 2015;17:27–34. (45)**

En este estudio se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos de una crema gel elaborada con extracto estabilizado de los frutos de *Passiflora mollissima* HBK al 15% con valores de 111.657 ± 2.823 mg de equivalentes de ácido gálico/100 mL muestra (método de Folin Ciocalteu), lo cual permitió establecer una relación con la actividad antioxidante con valores de 423.187 ± 2.345 µmol Trolox/mL muestra (método DPPH) y valores de 0.774 ± 0.0088 mmol Trolox/mL muestra (método ABTS). Se obtuvieron valores de 11.754 ± 0.241 FPS (método in vitro de Mansur) y un valor de FPS de 1.51 para el gel con extracto al 15% y un valor de 2.66 para la crema con el extracto al 15%. (45)

- **Moya TM, Osorio RI. Actividad fotoprotectora de formulación tópica a base del extracto hidroalcohólico de *Fragaria vesca* L. (fresa) [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2017. (46)**

En este estudio se evaluó la actividad fotoprotectora de una formulación tópica a base de extracto hidroalcohólico del fruto de fresa. El extracto hidroalcohólico fue preparado por filtración en bomba de vacío y se realizaron pruebas preliminares de identificación de compuestos fitoquímicos. El contenido de polifenoles totales fue medido mediante el método espectrofotométrico de Folin - Ciocalteu usando el ácido gálico como materia de referencia obteniéndose como resultado 15.50 mg GAE/g. La actividad antioxidante del extracto evaluada por el método espectrofotométrico DPPH que se comparó con el estándar ácido ascórbico, dio como resultado el valor de 81.22% de captación de radical libres para el extracto hidroalcohólico de *Fragaria vesca* L. La actividad fotoprotectora de las formulaciones tópicas desarrolladas fue evaluada según el método descrito por Mansur. El valor de FPS obtenido fue 12,05 el cual confirma la actividad fotoprotectora de los polifenoles totales de la fresa y el valor del FPS de la crema base mas el extracto hidroalcoholico de fresa al 5% dio un valor de 0.83. (46)

- **Alayo WE, Fiestas R, Ayala C, Castillo E. Desarrollo de una crema de hojas de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) con actividad fotoprotectora in vitro. Arnaldo A. 2018; 25(1):115–26. (47)**

El presente trabajo tuvo como finalidad desarrollar una crema a base del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper aduncum* (Piperaceae) incorporando un concentrado equivalente a 8.0 p/p y evaluar su actividad fotoprotectora in vitro. La primera etapa del estudio se inició con la recolección de las hojas de *Piper aduncum* “matico” del jardín botánico de plantas medicinales “Rosa Elena de los Ríos Martínez” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, por el método de herborización. La elaboración de la formulación se inició con la obtención del extracto por el método de percolación usando como solvente etanol de 70° GL, luego se determinó la concentración, para el posterior diseño de la crema y los respectivos controles organolépticos y fisicoquímicos. En la segunda etapa, se determinó la actividad fotoprotectora in vitro de la crema por método espectrofotométrico en la región de la radiación ultravioleta tipo B (UVB) de 290-320 nm. Respecto a los resultados, se obtuvo una concentración de 48.6 mg de extracto seco/mL, la crema desarrollada de tipo O/A tuvo aspecto homogéneo, con un factor de protección solar de 2.29 FPS. Se concluye que la crema fotoprotectora solar desarrollada a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* tiene un nivel de fotoprotección bajo según la clasificación de organismos internacionales (47).

2.2.3 ANTECEDENTES LOCALES

- **Morante C.A y Salas N.V. Evaluación de la capacidad fotoprotectora y antioxidante del extracto etanólico al 70% de la Cianobacteria *Nostoc sphaericum* Vauch (Llullucha) [Tesis]. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas; 2011. (48)**

Este estudio se propuso elaborar un fotoprotector a base del extracto etanólico al 70% de la cianobacteria ***Nostoc sphaericum*** Vauch (Llullucha). Desarrollando una forma farmacéutica de crema, concluyéndose que este extracto no presenta irritación dérmica a concentraciones prueba de 0.5%, 1.0% y 1.5%. Del ensayo de irradiación UVB para la determinación de la capacidad fotoprotectora in vivo las cremas al 0.5%, 1.0% y 1.5% del extracto etanólico presentaron valores de 1 para el eritema y valores de 0 para el edema, el patrón solo presento valores de 1 para el eritema. Se evaluó histopatológicamente los cambios morfológicos cutáneos como la hiperqueratosis, fibrosis dérmica, espongiosis, úlceras, congestión y costras obteniéndose un resultado de leve a moderado y en algunos casos no presenta con respecto al grupo de animales de experimentación tratados con la formulación al 0.5%, 1.0% y 1.5% .Se obtuvo un FPS de 13.90 para la formulación al 0.5%, un factor de 14.73 para la formulación al 1% y un FPS de 14.89 para la formulación al 1.5%. El extracto hidroalcohólico de ***Nostoc sphaericum*** Vauch (Llullucha), presento capacidad antioxidante con un IC500=787.416 (48).

- **Choque R. y Durand D. Z. Capacidad fotoprotectora in vitro e in vivo de una crema elaborada con el extracto etanólico al 96% de la semilla de *Glycine max* “Soja” [Tesis]. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas; 2014. (49)**

Este trabajo tuvo como objeto determinar la capacidad fotoprotectora de una crema elaborada con el extracto etanólico de ***Glycine max*** (soja). Se realizó la determinación del factor de protección solar prueba in vitro a las cremas con extracto etanólico de soja y a una crema comercial (filtro sol crema FPS30) obteniendo FPS 31 para el producto comercial, FPS 4.91 para crema al 1%, FPS 7.39 para la crema al 3% y FPS 8.83 para la crema al 5%. A las cremas al 1%, 3% y 5% se le realizaron la valoración de cambios inflamatorios y cambios morfológicos. Se concluye que la crema al 5% con el extracto etanólico al 96% de la semilla de ***Glycine max*** (soja) presenta mayor FPS. El grado de eritema y edema son menores con cremas al 3% y 5% y la intensidad de daño a la piel es menor con las cremas al 1% y 3%.(49)

- **Segura Li, Mamani A. Control de calidad fisicoquímico, microbiológico y determinación del factor de protección solar (SPF) de bloqueadores solares expendidos en los establecimientos farmacéuticos y centros comerciales del distrito de Wanchaq Cusco. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco; 2015. (50)**

El objetivo de este trabajo fue realizar el control de calidad fisicoquímico, microbiológico y comprobar los valores de los factores de protección solar (SPF) de 39 muestras de bloqueadores solares, usando el método espectrofotométrico UV-VIS y aplicando la

evaluación de Mansur para hallar el valor de SPF. Se realizó la evaluación de las características propias del producto, la evaluación de la etiqueta. En la evaluación de las características organolépticas, el aspecto homogéneo presentó inconformidad en el 38.5%, la reología presentó inconformidad del 10 % y el color una inconformidad del 3%, de acuerdo a los parámetros de la decisión 516 de la Comunidad Andina de Naciones (CAN). En la evaluación fisicoquímica se determinó el pH con rango de 4.5-8.5, dando conformidad del 100%, y la densidad con un intervalo de 0.8-1.2 g/mL de conformidad del 100%. En la evaluación microbiológica el recuento total de Aerobios Mesófilos Viables, de hongos filamentosos y levaduras, identificación de la presencia de ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***E.coli***, se procedió de acuerdo a los métodos propuestos en la USP 35 y las referencias Internacionales de la Comisión Europea, con límites permisibles microbiológicos que aceptan un máximo de 1000 UFC/g, con una conformidad aceptable. En cuanto a la determinación y comprobación de los bloqueadores solares entre sus valores de SPF, rotulados en la etiqueta y obtenidos por espectrofotometría se obtuvo conformidad de un 53.8% e inconformidad de 46.2%, por tanto se concluye que existe desconfianza al momento de obtener bloqueadores solares de cualquier SPF, ya que las industrias manufactureras, no brindan la veracidad en los rótulos del etiquetado, causando preocupación, por ser atentativos para la salud de los consumidores. (50)

2.3 ESTADO DE LA CUESTIÓN

Considerando que a nivel mundial, cada vez se toma más conciencia de los daños cutáneos y oculares generados por la radiación UV y que se busca garantizar un elevado nivel de protección de la salud pública, los productos de protección solar deben ser lo suficientemente eficaces frente a la radiación UVB y UVA (51). Al mismo tiempo, es necesario evitar el bloqueo de los efectos beneficiosos de la radiación UV, como la síntesis de vitamina D, la fotoadaptación (protección natural de la piel), la inmunodepresión de la inmunidad adquirida, la inducción de la inmunidad innata y los beneficios identificados más recientemente, como la reducción en la presión arterial por UVA (52).

En la actualidad existen varias moléculas de filtro UV sintéticas que están disponibles en el mercado pero tienen un uso limitado debido a que estas moléculas activas pueden crear efectos adversos en la piel humana y ser potencialmente dañinas (53). Información sobre posibles reacciones inducidas por fotones, como fotoirritación, fotosensibilización también incluye dermatitis de contacto por productos de protección solar que contengan agentes de protección solar orgánicos sintéticos. Para superar estos efectos secundarios, compuestos naturales han ganado una considerable atención como agentes fotoprotectores (51).

Específicamente, existe un creciente interés en las sustancias herbarias que ofrecen protección contra los efectos dañinos de los rayos UV. Las sustancias herbarias pueden actuar como adsorbentes de los rayos UV y antioxidantes y potencialmente tienen pocos efectos secundarios(7). Por lo tanto pueden calificar para brindar protección SPF y aumentar el FPS de las formulaciones existentes; entre ellos se incluyen extractos de galanga, café verde, regaliz, avena, annatto y muchos más activos naturales que

mejoran la solubilidad de los filtros UV, preservan naturalmente las formulaciones y mejoran la sensación y elegancia de la cosmética natural (54).

En este trabajo con la finalidad de contribuir a las investigaciones dermocosméticas relacionadas a la protección de la piel frente a las radiaciones UV; se plantea incorporar una formulación de crema a base del extracto etanólico al 96% de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) que por antecedentes de uso tradicional se conoce de forma empírica la acción fotoprotectora (11)(55).

2.4 BASES TEÓRICAS CIENTÍFICAS

2.4.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE ***Bixa orellana*** (achiote):

- Clase : Equisetopsida
- Sub clase: Magnoliidae
- Super orden: Rosanae
- Orden: Malvales
- Familia: Bixaceae
- Género: *Bixa* L.
- Especie: ***Bixa orellana* L.** (56)

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:

Árbol o arbusto de 3 a 8 metros de alto, con tronco leñoso, erecto y ramificado en su parte superior, forma una copa frondosa. Hojas persistentes, alternas y cordadas, ovadas o acorazonadas, lisas y puntiagudas, largamente pedunculadas, con escamitas pardas por el envés de 8 a 20 cm de largo. Flor hermafrodita, de tamaño regular de 4 cm de ancho, 5 pétalos de color blanco o rosado, se disponen en panículas terminales. Fruto en cápsula espinosa, que encierra la semilla en su interior, 3 a 4 cm de largo, ovoides o cónicos, café-rojizo o amarillo, pequeñas espinas lisas. Sus semillas son numerosas de 5 mm de largo, cubiertas de fina pulpa rojo-naranja (57).



Figura N° 01: ***Bixa orellana*** (58)

DISTRIBUCIÓN

Cultivado en Amazonas, Cusco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, San Martín, Ucayali.(59)

PARTE UTILIZADA

Las partes utilizadas son:

- Semillas de ***Bixa orellana* L.** (Achiote)

2.4.2 USOS TRADICIONALES

El achiote tiene numerosos usos medicinales. Los indígenas obtenían por maceración una sustancia de color rojo que empleaban para teñir el cuero, pintar sus cuerpos, repeler insectos y proteger su piel del agua salada y de las quemaduras de los rayos del sol (60)(31). La semilla que contiene la bixina posee cualidades expectorantes y regeneradoras. Estas semillas machacadas o el aceite constituyen un excelente cicatrizante cutáneo como también desinflamatorio frente a quemaduras leves, alivia los eczemas protege contra el herpes zoster y los rayos ultravioletas (31).

Por otro lado la hoja aplicada en la frente sirve para el dolor de cabeza. El cocimiento de las hojas utilizado en gárgaras sirve para tratamiento de la infección de boca y garganta y también se ha utilizado para evitar la caída del pelo. La decocción de la raíz, como bebida sirve para el asma (55).

Hay diversos usos medicinales secundarios como para los males del corazón, para las molestias respiratorias o renales, su capacidad hipoglicemiante y como antídoto para la intoxicación con la yuca amarga y del piñón de nuestra selva (9).

2.4.3 CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LA SEMILLA

El residuo de semilla de achiote tiene altos niveles de proteína, carbohidratos, fibra, mineral. Los minerales más abundantes encontrados fueron el potasio y el sodio. También se encontraron concentraciones substanciales de los aminoácidos lisina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina y valina (61). La ceniza 5,4% tienen alto contenido de fósforo, hierro y zinc (33).

Tabla N° 01: Constituyentes químicos de la semilla de ***Bixa orellana***

Parámetro	Medida*	%DRI	DRI(g)**
Humedad	6.75 ± 0.089	-	-
Residuo mineral fijo	5.22 ± 0.35	-	-
Lípidos totales	2.23 ± 0.11	4.05	60
Proteínas	11.50 ± 0.06	15.33	75
Carbohidratos totales	42.2 ± 0.69	14.06	300
Sacarosa	11.78 ± 0.02	-	-
Almidón	30.42 ± 0.58	-	-
Fibra	28.48 ± 0.91	113.92	25
Valor calórico total	234.46	11.72	2000
* Valores medios de 3 determinaciones ± desviación estándar. ** Ingesta dietética de referencia basada en una dieta de 2000 kcal (61)			
* Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2007). ** Limitación de aminoácidos; Nd: no determinado.			

Tabla N° 02. Composición y puntuación química (CS) de los aminoácidos esenciales de la proteína aislada (IP) del residuo de semilla de achiote y comparación con los requerimientos FAO/OMS para adultos.

	IP (mg.g ⁻¹ proteína)	CS	FAO* (mg.g ⁻¹ proteína)
Lisina	76.7	1.70	45
Histidina	7.2	0.48**	15
Treonina	10.9	0.47**	23
Valina	8.5	0.22**	39
Metionina	12.8	0.8**	16
Metionina + Cisteína	12.8	0.58**	22
Isoleucina	59.3	1.98	30
Cisteína	Nd	Nd	6
Leucina	83.9	1.42	59
Fenilalanina + Tirosina	100.2	3.34	30

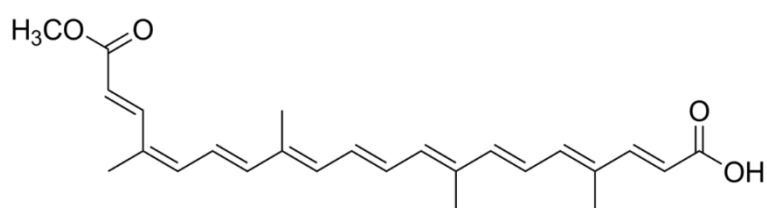
* Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2007). ** Limitación de aminoácidos; Nd: no determinado (61).

Las semillas se caracterizan por el alto contenido de bixina (62) y norbixina entre otros carotenoides y compuestos fitoquímicos que se encuentran en menores cantidades como isobixina, beta caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina y orellina, bixeina, bixol, crocetina, iswarane, ácido elágico, ácido salicílico (33), bixinato de sodio, ácido tomentósico, bixina, beta caroteno, pectina, vitamina A, cryptoxantina, luteína, metilbixina, zeaxantina (63), E-geranilgeraniol y farnesil acetona (34).

A través de pruebas fitoquímicas y espectroscopia infrarroja se encontró que la solución acuosa que se encuentra dentro de los frutos de ***Bixa orellana L.*** tiene altas concentraciones de taninos hidrolizados o pirogálicos (64). Mientras que los mayores niveles fenólicos totales se verificaron en los extractos más polares, logrando un máximo de 1,84 equivalentes de ácido gálico/g de semillas en el extracto metanol/agua (65).

BIXINA

Bixina posee una cadena isoprénica de 24 carbonos, conteniendo un ácido carboxílico y un éster metílico en las extremidades; su forma molecular es C₂₅H₃₀O₄. Representa el 80% de los pigmentos de ***Bixa orellana L.*** (66)(67).



A partir de la bixina es posible obtener otros pigmentos como la sal de norbixina (hidrosoluble), norbixina (liposoluble)(63) que es un derivado desmetilado de la saponificación de la bixina, siendo esta su forma de obtención para fines comerciales (66)(33). Una vez aislado de la semilla, la bixina se hace muy vulnerable a la degradación causada por el calor, la luz y la oxidación (33).

Principales aplicaciones del colorante bixina:

Hoy en día se sabe que en las plantas, los carotenoides actúan como pigmentos de absorción de la luz y en la transferencia de esta energía a la clorofila en el mecanismo de la fotosíntesis. Los carotenoides también actúan como filtros UV, en la protección de las plantas de la foto-oxidación, evitando que las células sean dañadas por el oxígeno singlete. Además que en situaciones de estrés o lesión en una exposición severa a la luz, estos compuestos protegen a las plantas de infecciones futuras o daño oxidativo (33) y poseen actividad antioxidante (68). Los carotenoides también son capaces de extinguir el estado triplete excitado de los sensibilizadores, que son especies relevantes en la oxidación de lípidos, vitaminas y proteínas. Los carotenoides también actúan como depuradores de los radicales libres (65).

En cosmética, el pigmento se aplica como la formulación de bronceado en la forma de extractos oleosos; productos de maquillaje tales como barras de labios (69) y post-facial; productos para el cabello tales como tinte y champús, así como en jabones. En la industria textil se emplea para teñir algodón, lana y seda particularmente, transmitiendo el efecto especial difuso de color amarillo-naranja. También se ha utilizado como pigmento en la industria del cuero y en la fabricación de pinturas, barnices, grasas y ceras (33).

Métodos de extracción

La bixina se encuentra en la cubierta exterior del fruto y representa más del 80% de los pigmentos presentes, lo cual facilita su extracción (70). Los métodos más comúnmente utilizados para extraer los pigmentos de las semillas de achiote son la extracción alcalina (sal de norbixina), la extracción con aceite (bixina) y la extracción con solventes, como acetato de etilo, etanol (71), cloroformo y acetona, para producir productos de mayor pureza (72).

La mayor parte de la bixina en las semillas de achiote se encuentra en la capa externa de la semilla. No obstante, existe una capa lipídica fuertemente asociada a la bixina en la semilla (73).

El mejor método identificado para obtener altos rendimientos en bixina es la extracción con solvente a baja presión utilizando etanol como solvente (73)(65). El etanol es considerado como el mejor solvente al extraer los metabolitos mas importantes de la semilla y sobretodo por contribuir a la tendencia general del mercado a identificar óptimos solventes que generen ventajas económicas, sociales y ambientales (74)(75).

SEGURIDAD

La Organización Mundial de la Salud reconoce su toxicidad cero tanto para el consumo humano y para su aplicación en la piel (70). El producto está registrado por la Unión

Europea bajo el nombre E160b (33). En Brasil, el uso de achiote es tan rutinario que su seguridad no está en duda (66).

En un estudio se investigaron el tiempo de retención en plasma, tanto de la bixina (cis y trans), como la norbixina (cis y trans). Siete voluntarios ingirieron una dosis única de 16 mg de colorante. Se observó que la bixina se elimina totalmente a lo sumo después de ocho horas en comparación con 24 horas norbixina (33).

Bixina y norbixina no presentan algún efecto deletéreo significativo sobre las células hepáticas, médula renal y hueso de ratones-ratas; aunque ningún efecto embriotóxico se ha demostrado en ratones, un grado significativo de interferencia con el control metabólico de la glucosa fue percibido en estos roedores (66)(76).

Estudios Farmacológicos: Se han realizado múltiples estudios para determinar la actividad biológica de ***Bixa orellana*** (achiote). Algunos de los más representativos se describen a continuación:

Acción antioxidante: Se evaluó el efecto de la norbixina en la respuesta al daño del ADN inducido por radiación UV, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y anión superóxido (O²⁻) sobre células de ***Escherichia coli***, y se obtuvo que la norbixina era capaz de proteger a la célula ante estos agentes. La norbixina aumentó la supervivencia de la célula en al menos 10 veces. Otros experimentos demostraron que la bixina actuaba como antioxidante interceptando los radicales libres generados por el daño cromosómico inducido por el agente clastogénico cisplatino (63).

Acción antimutagénica y antigenotóxica: Este estudio evaluó el potencial antimutagénico de la norbixina contra mutágenos oxidantes en ***Salmonella typhimurium*** y detectó una inhibición máxima de un 87% contra la mutagenicidad inducida por peróxido de hidrógeno; sin embargo se considera que aunque los datos indican que la norbixina protege frente al daño oxidativo, puede tener efecto pro-oxidante frente al ADN bajo determinadas condiciones. Otros estudios describen las potencialidades del achiote para prevenir las mutaciones que conducen al cáncer junto al propóleos y algunos hongos comestibles. También se han explicado las potencialidades antimutagénicas del achiote sobre la base de ensayos que demostraron la importante acción de la bixina en la disminución de la peroxidación lipídica (proceso inducido por la formación de radicales libres) y la proliferación de células tumorales. Gran parte de estos estudios clasifican al achiote como un suplemento nutricional antitumoral (63).

No se observó efecto significativo cuando los extractos de semillas de achiote se probaron actividad mutagénica en estudios realizados en los Estados Unidos y Brasil (77).

Acción como antiagregante plaquetario: ***Bixa orellana*** (achiote) inhibió la agregación inducida por la trombina de plaquetas humanas lavadas (63).

Acción inmunomoduladora: La bixina entre otros colorantes solubles en agua aumenta la producción de IgM a concentraciones tan bajas como 1mmol/L. Los autores concluyen que este colorante puede regular la producción de inmunoglobulinas (63).

Estudios Toxicológicos.

Los estudios de toxicidad aguda realizados para extractos de Achiote han demostrado su baja toxicidad. Un estudio realizado en ratas Wistar a las cuales se les administró una dosis 2 000 mg/kg/día de achiote, demostró que era prácticamente inocuo. Por otra parte, un estudio de tolerancia cutánea en conejos realizado con un extracto de **Bixa orellana** (achiote), no mostró alteraciones significativas, lo cual fue confirmado mediante estudios histológicos de muestras de piel y pelo. Otros investigadores emplearon en su estudio un extracto alcohólico de **Bixa orellana** (achiote) en piel rasgada de conejos Nueva Zelanda y concluyeron que el producto no es un irritante dérmico primario (78). Los estudios subcrónicos de toxicidad oral de un extracto de bixa administrados durante 13 semanas en ratas Sprague-Dawley tampoco presentaron signos tóxicos o letalidad (63).

Genotoxicidad y carcinogénesis: Estudio realizado en ratas se demostró que el extracto del achiote a dosis dietéticas de 0,3 % (200 mg/kg/día) careció de potencial modificador para la carcinogénesis hepática. En otro estudio realizado en ratas Wistar se reportó que el achiote no es genotóxica, ni carcinogénica a las altas concentraciones probadas (1 000 mg/L) (63).

Embriotoxicidad y toxicidad maternal:

Se administró Annatto (0, 31,2, 62,5, 125, 250 y 500 mg / kg de peso corporal / día) por gavaje a ratas Wistar en los días 6-15 del embarazo. Las cesáreas se realizaron el día 21. Se registraron los implantes, los fetos vivos y muertos y las reabsorciones. Los resultados sugieren que el annatto no es ni tóxico para la madre ni embriotóxico en ratas (79).

Estudios Clínicos

Este estudio desarrolló un procedimiento para la detección y determinación de la bixina y la norbixina en el plasma humano y se estudió la absorción de una dosis única de 1 mL de un extracto del achiote empleada como colorante de alimentos comercial (16 mg de cis-bixina en aceite de soya). Se detectaron ambos pigmentos con considerables variaciones entre un individuo y otro, en diferentes momentos del día con una aclaración plasmática completa de la bixina a las 8 h y de la norbixina a las 24 h del consumo, sin detección de efectos adversos entre los individuos estudiados. Tanto en el hombre como en las ratas los pigmentos del achiote son absorbidos del intestino a la sangre y la aclaración en sangre es bastante rápida (63).

Otro ensayo clínico en humanos donde se empleó el extracto del achiote en la hiperplasia prostática benigna, los individuos estudiados no mostraron ningún beneficio con respecto a los tratados con placebo, ningún efecto adverso fue detectado durante el estudio (80).

La OMS ha considerado que el estimado aceptable de consumo diario de achiote, expresado como bixina es de 0-0,065 mg/kg de peso corporal. Los seres humanos que recibieron una preparación comercial que contenía 16 mg de bixina y 0,5 mg de norbixina, las concentraciones de norbixina en la sangre fueron mayores que las de la bixina y persistieron durante más tiempo, ya que la bixina no pudo detectarse en el plasma 8 horas después de una dosis oral única mientras que la norbixina alcanzó un

pico después de 4 horas y todavía se detectó después de 48 horas. No está claro si la conversión de la bixina en norbixina ocurre en el cuerpo (81).

2.4.4 LA RADIACIÓN SOLAR

El sol siempre ha sido de vital importancia para la vida en la tierra da luz, calor y energía; la vida sería imposible sin su presencia (36).

La radiación solar abarca todo el espectro electromagnético, incluidos los rayos cósmicos, gamma cortos y de alta energía, los rayos UV de menor energía, la luz visible, la radiación infrarroja (IR), las microondas y finalmente las ondas de radio.(54)

La vida se hizo posible porque la naturaleza proporcionó un sistema sofisticado adicional de protección. Las radiaciones solares más cortas y dañinas no pueden alcanzar la superficie de la tierra mediante dos escudos protectores, o esferas de gas huecas que envuelven a la tierra. El exterior es la ionosfera, que refleja los rayos X de vuelta al espacio. El interior es la capa de ozono, que absorbe los rayos UV más cortos. Además, una gran parte de la radiación infrarroja es absorbida por el vapor de agua en la atmósfera (36).

Su distribución espectral en función de las longitudes de onda es:

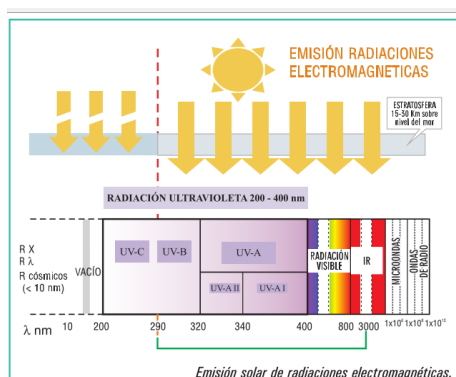


Figura N°02: Emisión solar de radiaciones electromagnéticas (82)

Radiación infrarroja: La radiación infrarroja comprende longitudes de onda superiores a 800 nm, comprende el 50% de la radiación solar (36)(4). Esta radiación provoca en la piel una sensación de calor e incluso puede producir eritema, es responsable de la pérdida de agua cutánea y potencia los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (14)(83).

Luz visible: La radiación solar terrestre está constituida por un 40 % de luz visible, con una longitud de onda entre 400 – 800 nm (4)(36). Esta radiación es la responsable de la sensación visual o el efecto de luz donde se exhibe el arco iris de los colores del espectro de violeta a rojo (54)(83).

Radiación ultravioleta: Es la banda espectral de mayor energía que alcanza la biosfera y comprende longitudes de onda entre 200 - 400 nm y representa el 10% de radiación solar (36)(84). Este tipo de radiación se caracteriza por inducir efectos biológicos sobre aquellos compuestos que absorben directamente los fotones. De allí su importancia por

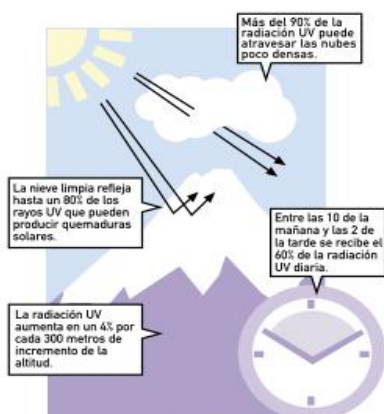


Figura N°03: Factores que alteran la intensidad



sus posibles efectos perjudiciales en la piel del ser humano por la exposición acumulativa o intermitente intensa a esta radiación (85)(20). La intensidad de la luz UV depende de factores como la altura del sol, la hora del día, la época del año, la latitud con la respecto a la línea ecuatorial, la nubosidad, la altitud, la concentración de ozono en la superficie terrestre y la reflexión producida por el suelo u otras superficies (86).

La radiación ultravioleta se divide arbitrariamente en tres bandas de diferentes longitudes de onda. En la región óptica, los rayos UV tienen las longitudes de onda más cortas y las energías más altas asociadas con ellos. Estos rayos son lo suficientemente energéticos como para causar reacciones fotoquímicas, lo que da como resultado daños

inmediatos y retardados en la piel y el cabello, lo que se denomina efecto fotoquímico.(54)

Aunque inicialmente fue clasificada por el Segundo Congreso Internacional sobre la Luz en 1932, los fotobiólogos ambientales y dermatológicos comúnmente usan divisiones ligeramente diferentes, más estrechamente asociadas con el efecto biológico de las diferentes longitudes de onda. (13)

Estos son:

Radiación UVA : Se extiende desde los 320 a 400 nm (4) lo que representa una gran parte del espectro, aproximadamente el 90-95% de la luz incidente UV en la superficie terrestre, ya que no es absorbida por la capa de ozono (46). Los rayos UVA no se filtran por el cristal, sufren poca fluctuación temporal, no se afectan apenas por la altitud ni por las condiciones atmosféricas y el 50% penetran en la piel en profundidad, alcanzando la dermis e incluso afectando a las células sanguíneas circulantes (85). Esta radiación se divide en dos sub rangos, UVA I (340-400 nm) y UVA II (320-340 nm) (82).

A estos rayos se los conoce como rayos bronceadores ya que penetran profundamente en la capa de la dermis de la piel, estimulando así la formación de melanina, la capa protectora de defensa natural del cuerpo. Hasta la década de 1970, se consideraban relativamente inofensivos y en muchos casos se asociaron con la formación de un bronceado saludable. La evidencia reciente, sin embargo, ha implicado estos rayos energéticamente más débiles, aún más penetrantes, con la mayor incidencia de cánceres de piel (87). Los investigadores han implicado radiación UV-A con efectos moleculares y tisulares, flacidez de la piel y la introducción de mellas en el ADN celular. La mayor parte del daño UV-A parece implicar la presencia de oxígeno y metales traza, de ahí la creciente popularidad del uso de antioxidantes y secuestradores de radicales libres de oxígeno singlete (54).

Radiación UVB : Comprende desde los 290 a 320 nm (4), es la radiación más energética que causa la mayoría de las reacciones fotobiológicas ocasionadas por la luz solar (85). También llamados rayos ardientes o eritematosos son responsables de la mayor parte del daño inmediato a la piel, lo que produce eritema o quemaduras solares y su consiguiente daño a largo plazo (54).

Diferencias entre la radiación UVA y UVB

- La cantidad de UV-A solar que llega a la superficie de la Tierra es enormemente mayor que la de UV-B.
- Las reacciones de fotosensibilidad (fototoxicidad y fotoalergia) están mayormente mediadas por UV-A.
- UV-A puede potenciar o aumentar los efectos biológicos de UV-B.
- UV-A se transmite por la mayoría del vidrio de ventana y muchos plásticos que no transmiten UV-B.
- Estudios recientes sugieren que UV-A puede afectar células y microorganismos.
- Existe evidencia experimental y epidemiológica que sugiere que el UV-A solar es uno de los posibles agentes etiológicos para ciertos tipos de cataratas en humanos (54).

Radiación UVC: Las radiaciones UV de mayor energía son las de tipo C, con longitudes de onda de 200 a 290 nm, éstas junto a otras radiaciones (radiación X, Gamma y Cósmica), son retenidas totalmente por la capa de ozono en la estratósfera y no alcanzan la superficie terrestre (4). Cualquier agotamiento significativo de la capa protectora de ozono de la tierra plantearía un peligro que es inimaginable (54). Este tipo de radiación es emitida por fuentes artificiales tales como lámparas germicidas y lámparas de arco de mercurio.

EFFECTOS DE LA RADIACION SOLAR

La radiación solar es fuente de vida en la tierra, pero la exposición a ésta de forma incontrolada supone un riesgo ambiental para la salud, por sus posibles efectos perjudiciales principalmente en nuestra piel (85).

LA PIEL

La piel es un órgano complejo que protege al huésped de su ambiente y al mismo tiempo permite la interacción del organismo con el ambiente circundante. La piel es una estructura dinámica encargada de mediar varias funciones como constituir una barrera física de permeabilidad, protección contra los agentes infecciosos, termorregulación, sensaciones, protección contra la luz ultravioleta, reparación de las heridas, regeneración y apariencia física externa (88).

Las diferentes funciones de la piel están mediadas por una o varias de sus tres principales regiones: la epidermis, la dermis y la hipodermis.

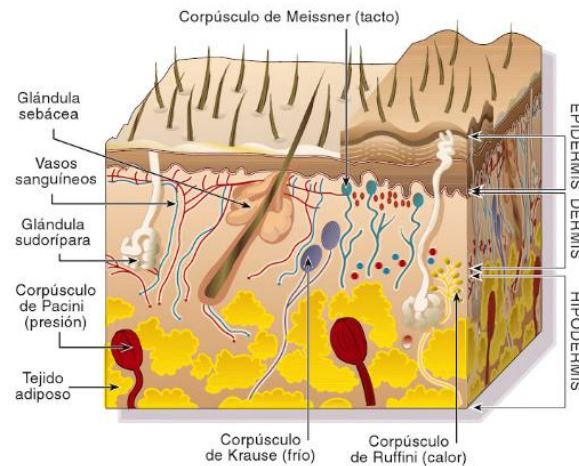


Figura N° 04: Principales regiones de la piel (89)

Epidermis: La epidermis ("sobre la piel") es un epitelio estratificado pavimentado y queratinizado que contiene cuatro tipos diferentes de células (84):

- Los queratinocitos, son células que confieren protección física y mecánica, producen queratina, antibióticos y enzimas que desintoxican la piel de las sustancias nocivas a las que está expuesta (90).
- Las células epiteliales táctiles, o células de Merkel. Cada célula epitelial táctil semiesférica está íntimamente asociada a una terminación sensorial nerviosa similar discoide y funciona como un receptor táctil (90).
- Los melanocitos se agrupan en el lado superficial de los queratinocitos, entre la radiación recibida y los núcleos celulares, protegiendo así los núcleos celulares de los rayos UV que pueden dañar el ADN y provocar cáncer. Se ha reconocido el papel de los melanocitos en la pigmentación de la piel además los melanocitos también secretan una serie de moléculas de señalización en respuesta a la radiación ultravioleta que actúa en la modulación de la respuesta inmune en la piel (90).
- Las células dendríticas se dispersan entre los queratinocitos del estrato espinoso éstas células estrelladas forman parte del sistema inmune (90).

La dermis: Tejido resistente - elástico que actúa de almohadilla del cuerpo frente a lesiones mecánicas y proporciona nutrientes a la epidermis y apéndices cutáneos. Los tipos de fibras colágenas, elásticas y reticular también son característicos de la dermis donde también se albergan los sistemas nervioso, linfático y sanguíneo que rodean los folículos pilosos con sus glándulas asociadas y las glándulas sudoríparas ecrinas (84)(90).

Hipodermis: Por debajo de la piel se sitúa la hipodermis que consiste en los tejidos conjuntivos flojos y adiposos. Tiene como funciones almacenar la grasa evitando la pérdida térmica en el cuerpo y adherir la piel al tejido muscular (90).

EFFECTOS POSITIVOS DE LA RADIACIÓN SOLAR

La exposición moderada del cuerpo humano al sol produce, psicológicamente y fisiológicamente, una sensación de salud, sosiego mental y bienestar general. Además que la radiación estimula la circulación sanguínea, aumenta la formación de

hemoglobina y promueve la reducción de la presión sanguínea y también la síntesis de la vitamina D, incrementando la absorción del calcio del intestino. La radiación solar se ha utilizado en el tratamiento de ciertos tipos de tuberculosis de ciertas enfermedades cutáneas, como la psoriasis. También al producir melanina y originar un engrosamiento de la piel, desempeña un papel esencial en la formación del mecanismo de protección natural del cuerpo a las quemaduras (84).

EFFECTOS NEGATIVOS DE LA RADIACIÓN SOLAR

El daño asociado con la sobreexposición a la luz UV ha sido demostrada en muchos estudios y se han identificado una serie de otros efectos adversos tanto a corto como a largo plazo sobre la salud (13).

El UVC es totalmente absorbido por el ozono atmosférico y tiene una penetración mínima en la superficie de la Tierra por lo tanto tiene muy poco efecto en la salud humana. El ozono atmosférico absorbe el 90% o más de los rayos UVB, mientras que los rayos UVA atraviesan la atmósfera con pocos cambios. Por lo tanto, la radiación solar ultravioleta de importancia para la salud humana consiste en rayos UVA y UVB (13).

Si la piel de los mamíferos se somete a una exposición crónica de radiación UV, se inducen varias respuestas biológicas, por ejemplo: el desarrollo de eritema, edema, quemaduras de las células, hiperplasia, inmunosupresión, daño en el DNA, fotoenvejecimiento y melanogénesis. Estas alteraciones pueden estar directa o indirectamente involucradas en el desarrollo de cáncer (4)

La radiación UVA se considera como la “radiación de envejecimiento” causante del bronceado de la piel (82) que es capaz de penetrar profundamente en la epidermis y en la dermis de la piel. Es más eficaz que la UVB en lograr un curtido de la piel inmediato que se produce por oscurecimiento de la melanina en la epidermis. La piel se puede quemar si es sometida a exposiciones intensas y prolongadas de radiación UVA dañando las estructuras en el corion causando fotoenvejecimiento prematuro de la piel, así como elastosis solar. En estas zonas se pueden suprimir algunas funciones inmunológicas, y se pueden desencadenar procesos oxidativos donde se generen especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden causar el daño a las proteínas celulares, lípidos y carbohidratos. También pueden generarse especies reactivas del nitrógeno y este exceso de radicales libres provoca una cascada de eventos que propician un deterioro progresivo de las estructuras y funciones celulares. La lesión de UVA tiende a causar necrosis de las células endoteliales, dañando los vasos sanguíneos dérmicos. Dado que este tipo de radiación puede producir daño estructural al DNA y dañar el sistema inmunológico, puede llevar a la formación de cáncer (82). La misma se ha relacionado con el 67% de los melanomas malignos (4) (54).

La radiación UVB se considera como la “radiación de quemaduras” (82). Es capaz de penetrar en la epidermis actuando principalmente a nivel de la capa basal de células, dañando el genoma de los queratinocitos. Produce efectos biológicos adversos directos e indirectos por ejemplo: formación de fotoproductos, isomerización de trans a cis- ácido urocánico, inducción de la actividad ornitina descarboxilasa, estimulación de la síntesis de DNA, detención del ciclo celular, fotoenvejecimiento prematuro y fotocarcinogénesis. Es característico también la formación de estrés oxidativo con la producción de radicales

libres en la zona irradiada, además una excesiva radiación de UVB disminuye los niveles de enzimas antioxidantes en la piel posibilitando una disminución de su capacidad de defensa frente a los procesos oxidativos generados a posteriori de las radiaciones. También disminuye el sistema inmune y se considera que es responsable de inducir cáncer en la piel de tipo escamoso y carcinoma de células basales (4) (30).

La radiación UVB más energética causa la mayoría de las reacciones fotobiológicas en la epidermis y sólo el 10% de ella pasa a la dermis (85) (86).

Quemaduras solares

Los síntomas de las quemaduras solares son el resultado directo de la lesión o destrucción de células en la capa celular espinosa de la piel, posiblemente por desnaturalización de sus constituyentes protéicos. Las sustancias similares a la histamina liberadas por las células dañadas son responsables de la dilatación de los vasos sanguíneos y del eritema. También causan hinchazón de la piel (edema) y estimulan las células basales de la piel a la proliferación. Durante el período de latencia precedente a la aparición de los síntomas de las quemaduras solares, los productos de degradación fotoquímica formados como consecuencia de la irradiación solar se consideran que desencadenan una serie de reacciones de radicales libres que conducen a la formación de sustancias biológicamente activas, como se ha comentado anteriormente, que se difunden a través de los vasos sanguíneos dérmicos y producen los síntomas descritos (84).

Existen cuatro grados de quemaduras solares:

- Eritema mínimo perceptible: una ligera, pero discernible coloración roja o rosácea de la piel producida en veinte minutos.
- Eritema intenso: una coloración roja brillante de la piel, no acompañada de dolor alguno, producida en cincuenta minutos.
- Quemadura dolorosa: caracterizada tanto por eritema intenso como por dolor, variando desde leve a intensa, producida en cien minutos.
- Quemadura con ampollas: caracterizada por un extremadamente alto nivel de dolor acompañado de eritema intenso y, posiblemente, de síntomas sistemáticos con ampollas y descamación, producido en doscientos minutos.

Las quemaduras producidas por el sol no dejan cicatriz alguna. Una quemadura leve protegida de exposición posterior al sol desaparece al cabo de 24 – 36 hras. Las quemaduras más graves generalmente se curan al cabo de cuatro a ocho días. Si la inflamación subsiste, ésta irá seguida por la descamación (84).

Exposición Crónica

Los efectos crónicos comprenden dos grandes problemas sanitarios: los cánceres de piel y las cataratas. Cada año, se producen en todo el mundo entre dos y tres millones de casos de cáncer de piel no melánico y aproximadamente 132 000 casos de cáncer de piel melánico. Los cánceres de piel no melánicos se pueden extirpar quirúrgicamente y rara vez son mortales, pero los melanomas malignos contribuyen de forma sustancial a la mortalidad en las poblaciones de piel clara. Por otro lado entre 12 y 15 millones de personas padecen de ceguera causada por cataratas. Según estimaciones de la OMS,

hasta un 20% de estos casos de ceguera pueden haber sido causados o haberse agravado por la exposición al sol, especialmente en la India, Pakistán y otros países del llamado “cinturón de cataratas”, la zona de mayor mayor incidencia, cercana al ecuador (86).

CÁNCERES DE PIEL NO MELÁNICOS

El carcinoma basocelular: Es el más común de todos se caracteriza por ser localmente invasivo, de crecimiento lento y escaso riesgo de metástasis. Sin embargo si no son tratados oportunamente o en forma adecuada la primera vez son capaces de provocar grandes destrucciones de la cara y tendencia a la recidiva (91).

Carcinoma epidermoide: También llamado epitelioma espinocelular o carcinoma de células espinosas. Se trata de una neoplasia maligna derivada de las células de la epidermis o sus anexos, con capacidad de producir metástasis a ganglios regionales u otros órganos (91).

MELANOMA MALIGNO

El melanoma maligno (MM) es una neoplasia derivada de los melanocitos que suelen localizarse en la unión dermoepidérmica. A pesar de que su incidencia es baja, menor e 10%, 75% de las muertes por cáncer cutáneo se debe a esta neoplasia (92).

- El principal factor de riesgo de MM en poblaciones de piel clara es la presencia de numerosos nuevos (lunares) atípicos. Al parecer, un importante factor de riesgo de sufrir MM es la exposición alta e intermitente a la radiación UV solar ya que varios estudios epidemiológicos demuestran la existencia de una asociación positiva con los antecedentes de quemaduras solares, particularmente en edades tempranas (86).
- No está claro qué papel desempeña la exposición solar acumulada en el desarrollo del MM. No obstante, el riesgo de MM es mayor en personas con antecedentes de CPNM o queratosis actínica, indicadores ambos de la exposición acumulada a la radiación UV (86).

EFFECTOS OCULARES:

La fotoqueratitis y la fotoconjuntivitis son efectos agudos de la exposición a la radiación UV. Estas reacciones inflamatorias de los tejidos “seudocutáneos” extremadamente sensibles del globo ocular y de los párpados son parecidas a las de una quemadura solar y habitualmente aparecen pocas horas después de la exposición. Ambas reacciones pueden ser muy dolorosas, pero son reversibles y no ocasionan daños a largo plazo en el ojo ni en la visión. La “queratitis por soldadura al arco” y la “ceguera de la nieve” son formas extremas de fotoqueratitis (86). Por otro lado la exposición a la luz solar, particularmente a los componentes de la luz UVB, muestra una asociación con la catarata cortical, lo que ha sido demostrado a través de múltiples estudios (93).

Índice ultravioleta

El índice UV solar mundial (IUV) es una medida de la intensidad de la radiación UV solar en la superficie terrestre que tiene relación con los efectos sobre la piel humana. El IUV es el fruto de una labor internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en

colaboración con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), la Organización Meteorológica Mundial (OMM), la Comisión Internacional sobre Protección contra la Radiación no Ionizante (ICNIRP) y la Oficina Federal Alemana para la Protección contra la Radiación (Bundesamt für Strahlenschutz, BfS). El índice se expresa como un valor superior a cero, y cuanto más alto (valores de 0 a 16) mayor es la probabilidad de lesiones cutáneas y oculares y menos tardan en producirse esas lesiones (86).



Figura N° 05: Índice ultravioleta y recomendaciones (86)

Fotoprotección

La fotoprotección tiene como objetivo prevenir el daño que ocurre en nuestra piel como resultado de su exposición a la radiación ultravioleta (UV). Por tanto, las estrategias de fotoprotección se centran en reducir el tiempo global de exposición al sol, especialmente en las horas del mediodía (12:00 a 16:00 h), llevar ropas adecuadas, utilizar gorros y gafas y aplicar fotoprotectores (85).

- Fotoprotección exógena: Este tipo de fotoprotección incluye todos los métodos y estrategias usadas por el sujeto para disminuir los efectos adversos de las radiaciones solares sobre la piel. Realizando actividades como evitar la radiación solar, ponerse a la sombra y utilizar gorros y ropas, hasta la aplicación o ingestión de sustancias destinadas a este fin, conocidas como fotoprotectores (36).
- Fotoprotección intrínseca de la piel: Los factores responsables principales de la protección natural de la piel frente a quemaduras solares son el espesor del estrato córneo, la pigmentación (producción de melanina), la activación de moléculas antioxidantes, los sistemas de reparación del ADN y la síntesis de citosinas. (85)(84)(6)

El incremento en el contenido de melanina de la epidermis genera cierto grado de protección frente a la quemadura solar. Los gránulos de melanina que se forman en las células de la capa basal de la piel a consecuencia de la acción de la radiación UV-B emigran hacia arriba en dirección al estrato córneo y a la superficie de la piel, donde se piensa que son oxidados por la radiación de la zona UV-A. Estos gránulos se

desprenden finalmente durante la descamación, ocasionando a la piel su pérdida de inmunidad a las quemaduras solares (84).

HAIS y ZENISEK han sugerido que el ácido urocánico presente en el estrato córneo, en proporción del 0.6 por 100, puede actuar como un agente filtro fisiológico natural, al absorber la radiación ultravioleta del intervalo 300-325 μm (84).

La piel dispone de un sistema de antioxidantes que le protegen del estrés oxidativo generado por la luz solar y la polución. Este sistema se compone de antioxidantes enzimáticos, que actúan principalmente a nivel intracelular. Se incluyen la glutatión peroxidasa y reductasa, que reducen el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos lipídicos utilizando el glutatión, la catalasa que detoxifica el peróxido de hidrógeno, la Cu-Zn-superóxido dismutasa y la Mn-superóxido dismutasa que protege a las células frente al radical superóxido y la superóxido dismutasa (85).

Fototipos de piel

Denominamos fototipo a la capacidad eritematogénica y melanogénica que presenta cada persona en respuesta a la radiación solar. Fitzpatrick clasificó los tipos de piel en 6 fototipos (14).

La clasificación más común de tipos de piel para sensibilidad UVR es la escala de Fitzpatrick.

Tabla N°03: Tipos de piel

Tipo	Descripción
I	Caucásicos de piel clara que se queman muy fácilmente y nunca se broncean
II	Caucásicos de piel clara que se queman fácilmente y se broncean lentamente y con dificultad
III	Caucásicos de piel mediana que se queman raramente y se broncean con relativa facilidad
IV	Caucásicos de piel más oscura que prácticamente nunca se queman y broncean fácilmente, p. algunas personas con ascendencia mediterránea.
V	Piel asiática o india
VI	Afro-caribeño o piel negra

Tipos de piel para sensibilidad UVR – Escala de Fitzpatrick (13)

FILTROS SOLARES

Los filtros solares son preparados que se aplican sobre la piel con el fin de reducir los efectos de la radiación solar sobre la misma, estos actúan fundamentalmente de dos formas, desviando o reflejando la radiación y absorbiéndola. Atendiendo a su composición se les clasifica en dos grupos: filtros físicos y filtros químicos (6)(94).

El filtro solar físico proporciona protección a través del efecto de cobertura sobre la piel. En su mecanismo de acción se verifica que no ocurre interacción entre el fotón y la partícula del filtro. Los representantes de este grupo son: óxido de zinc, talco, caolín y dióxido de titanio. Pueden ser recomendados para todos los tipos de piel, siendo

especialmente utilizados en los productos destinados al público infantil y deportes acuáticos. En general, son sustancias reflectoras opacas que protegen contra la luz visible y las radiaciones ultravioletas A y B. Sin embargo, pueden ser cosméticamente poco aceptables (95).

Los filtros químicos son compuestos aromáticos conjugados con grupos carboxílicos y generalmente poseen un grupo donante de electrones como por ejemplo una amina o metoxilo en la posición “orto” o “para” del anillo aromático (96). Estas moléculas absorben los fotones de la radiación solar alterando su estructura molecular (3). Cada molécula presenta un espectro de absorción óptimo que permite clasificarla en filtro UVA o filtro UVB. Los cambios en su estructura molecular pueden traducirse en cambios en su estructura química, de modo que a veces producen dermatitis de contacto (6). Los filtros químicos poseen moléculas con dos porciones: cromófora y auxocrómica. La porción cromófora es capaz de absorber las radiaciones de un determinado tipo de onda. La porción auxocrómica modifica la capacidad de absorción del componente cromóforo (95).

Según su espectro de absorción los filtros químicos pueden dividirse en:

Fotoprotectores UVB. Los fotoprotectores UVB incluyen el ácido paraaminobenzoico (PABA) y sus ésteres (padimato A y O), los cinamatos, los salicilatos y el octocrileno. Todos ellos bloquean de forma eficaz alrededor del 90% de las radiaciones UVB en su espectro completo (290-320 nm) y por tanto ofrecen protección frente a la quemadura y el eritema inducidos por estas radiaciones. El PABA y sus derivados fueron los primeros en utilizarse de forma generalizada, pero pronto su uso se limitó debido a las frecuentes reacciones cutáneas adversas que provocaban. En la actualidad, los cinamatos se han convertido en el ingrediente más común de los fotoprotectores de UVB. Los salicilatos absorben menos la radiación UVB que los dos grupos anteriores, pero su perfil de seguridad es excelente y solubilizan otros ingredientes de los fotoprotectores, como la avobenzona y la oxibenzona. El octocrileno, químicamente emparentado con los cinamatos, es muy fotoestable y aumenta la resistencia del fotoprotector al agua. El fenilbenzimidazol es hidrosoluble, lo que permite así formulaciones menos grasas (85) (14).

Fotoprotectores UVA. La mayoría de los filtros de la radiación UVA absorben también algo de UVB. Incluyen las benzofenonas, las antralinas, la avobenzona y el ácido tereftalideno-dialcanfor sulfónico (Mexoryl SX). La oxibenzona es la benzofenona más utilizada y absorbe los UVB y los UVA cortos. Sin embargo, la avobenzona y el Mexoryl SX absorben todo el espectro de radiación UVA, si bien la avobenzona es muy poco fotoestable y el Mexoryl SX mucho (hasta 3 h). Los derivados del alcanfor no están autorizados en Estados Unidos, pero sí en Europa (85)(98).

Fotoprotectores UVB y UVA. Algunos filtros absorben tanto las radiaciones UVB como las UVA. El drometrizol trisiloxano (Mexoryl XL) absorbe los UVB y los UVA II, y formulado con el Mexoryl SX potencia su efecto fotoprotector. En los últimos años ha aparecido un filtro orgánico, el dibenzotriazol, que posee un espectro de absorción amplio (UVB, UVA cortos y UVA largos) y es muy fotoestable. Su peso molecular es elevado, por lo que no puede penetrar en la piel, de forma que sus mecanismos de acción son de dos tipos: absorción de energía por transferencia a los hidrógenos

intramoleculares y desactivación térmica por reflexión gracias a las partículas sólidas insolubles. Los fotoprotectores químicos son incoloros y cosméticamente muy aceptados, por lo que suelen añadirse a cosméticos. Sin embargo, presentan un mayor riesgo de causar reacciones de contacto y fotocontacto que las pantallas minerales (98).

Protectores solares naturales:

El uso de más ingredientes "naturales" es una tendencia creciente de comercialización en todas las áreas del cuidado personal y la protección solar no es una excepción. Se ha demostrado que diversos extractos botánicos tienen efectos protectores del sol, en virtud de contener antioxidantes o especies químicas que pueden actuar como filtros UV (36). Kapsner et al. mencionaron la absorción UV como significativa de los siguientes extractos naturales, que pueden proteger la piel por mecanismos distintos a la absorción UV:

- Annatto
- Gamma oryzanol (extraído del aceite de salvado de arroz)
- Regaliz (*Glycyrrhiza glabra*)
- Aceite de semilla de inóxido de *Calophyllum*
- Pongamol (proporciona protección UVA (36)

FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR

Se denomina FPS o factor de protección solar la relación entre el tiempo necesario para la aparición de un eritema usando filtro solar y el tiempo necesario para generar el mismo eritema sin filtro a las 24 horas de la irradiación. La FDA aprobó la determinación del factor de protección solar FPS como la técnica de referencia para valorar la eficacia de los protectores solares contra la quemadura solar (97).

Obsérvese que el factor de protección solar sólo indica la capacidad de protección frente al eritema y no frente a los otros efectos producidos por la radiación UVA corta o larga. En 1996 la European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA) desarrolló una propuesta de clasificación de los productos solares según su valor de FPS:

- FPS 2-5: protección baja.
- FPS 6-11: protección moderada.
- FPS 12-19: protección alta.
- FPS 20-+: protección extrema.

Un factor de protección 15 es capaz de filtrar más del 92 % de la radiación solar incidente.

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL FPS

Son la asociación de los filtros utilizados, su fotoestabilidad, su compatibilidad con los excipientes y sus propiedades de lipo/hidrosolubilidad.

2.5 MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

CREMA: Emulsión que a menudo contiene más de 20% de agua y sustancia volátiles y/o menos de 50% de hidrocarburos, ceras o polioles como vehículos para el API. Las cremas, por lo general, están destinadas para la aplicación externa sobre la piel o las membranas mucosas (99).

CROMÓFORO: Molécula que absorbe energía (14).

EDEMA: es una hinchazón causada por la acumulación de líquidos en los tejidos.(100)

ERITEMA SOLAR: O quemadura solar, es la expresión de la reacción inflamatoria provocada por una excesiva exposición solar. Se caracteriza por el rojo de la piel y la congestión (101).

FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR: Es la medida del nivel de protección contra la radiación UV (102).

FOTOENVEJECIMIENTO: Es un proceso que se caracteriza por la aparición prematura de lesiones en la piel cuando no se toman precauciones frente a la exposición solar (103).

FOTOPROTECCIÓN: La fotoprotección tiene como objetivo prevenir el daño que ocurre en la piel como consecuencia de la exposición a las radiaciones ultravioletas (85).

RADIACIONES ULTRAVIOLETA: Rayos invisibles que forman parte de la energía que viene del sol. Puede producir daños a la piel, envejecimiento prematuro, causar melanoma, otros tipos de cáncer, problemas en los ojos y el sistema inmunitario (6).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Muestra botánica: Semillas de ***Bixa orellana*** (achiote)
- 51 ratones albinos hembras de la especie *Mus musculus*, cepa Balb/c/CNPB de 2 a 3 meses de edad y con un peso promedio de 30 gramos.

3.1.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Vasos de precipitados de 50 mL
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Vasos de precipitados de 1000 mL
- Fiolas de 10 mL
- Fiolas de 25 mL
- Fiolas de 50 mL
- Fiolas de 100 mL
- Baguetas
- Pipetas de 5 mL
- Probetas de 50 mL
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Embudo de vidrio
- Frasco ambar 1000 mL tapa rosca
- Espátulas de metal
- Matraz erlen meyer 200 mL
- Portaobjetos de cuarzo
- Gradilla por 60 tubos
- Soporte universal
- Pinzas para tubos
- Piseta por 500 mL
- Viales de 5 mL
- Papel filtro #40
- Cinta hipoalergénica semi – oclusiva marca 3M.

3.1.3 INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

- Balanza analítica
- Baño Maria selecta. Temperatura máxima: 60 °C
- Espectrofotómetro UV Vis, rango: 200nm a 1100nm, ancho de banda: 1nm, precisión: +-0.5nm, 5 cubetas en un solo uso, soporte para cubetas de 10nm
- Estufa
- Lampara UVA-UVB Repti Glo 5.0 compact (Exo Terra)

3.1.4 OTROS

- Cinta adhesiva
- Esparadrapo
- Gasas
- Plumón indeleble
- Cámara fotográfica
- Bolsas de polietileno
- Guantes de látex
- Cuaderno de apuntes
- Lapicero
- Tijera lupa
- Jaulas para animales
- Etiquetas adhesivas
- Jeringas descartables 1 mL
- Jeringas descartables 3 mL
- Papel aluminio
- Recipientes de almacenamiento
- Tecnopor
- Alfileres

3.1.5 SOLVENTES Y REACTIVOS

3.1.5.1 PARA LA MACERACIÓN DE SEMILLAS DE ACHIOTE (***Bixa orellana***)

- Alcohol al 96%

3.1.5.2 PARA LA MARCHA FITOQUÍMICA

- Cloruro férrico al 5%
- Magnesio metálico
- Reactivo de Molish: solución 3 α -naftol y H₂SO₄ concentrado
- Reactivo de Benedict: Sulfato cúprico, Citrato de sodio, Carbonato anhidro de sodio
- Reactivos para Shinoda: HCl concentrado, cinta de Mg, alcohol amílico
- Solución de gelatina al 5%
- Reactivo Rosenheim: HCl concentrado, alcohol amílico
- Solución de Ninhidrina: reactivo de ninhidrina
- Reactivo de Dragendorff: HCl al 1% y reactivo dragendorff
- Reactivo de Mayer: HCl al 1%, NaCl y reactivo Mayer
- Reactivo de Borntrager: Solución de NaOH

3.1.5.3 PARA ENSAYOS DE IRRITACIÓN DÉRMICA PRIMARIA DE EXTRACTO DE SEMILLAS DE ACHIOTE EN RATONES ALBINOS

- Suero Fisiológico
- Tween 80

3.1.5.4 PARA LA DETERMINACIÓN DE FPS

- Etanol 99%
- Bahia superblock 55

3.1.5.5 PARA LA VALORACIÓN DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS CUTÁNEOS

- Formol 10%
- Reactivo de tinción (hematoxilina-eosina)

3.1.5.6 PARA LA ELABORACIÓN DE LA CREMA

- Agua
- PolybaseCrystal G/AE: Estearato de glicerilo, Alcohol cetearílico, Ácido esteárico, Cocoil Glutamato de Sodio.
- Polymol 812: Triglicérido Caprílico / Capríco
- Polymol CTV: Oleato de Decilo
- Salinip: Fenoxietanol, Metil parabeno, Etil parabeno, Butil parabeno, Isobutil parabeno
- Rheosol AVC: Acrilamida / Copolímero De Acrilato De Sodio, aceites y ceras minerales y Alcohol de tridecilo

3.1.5.7 PARA LA PRUEBA DE IRRITACIÓN DÉRMICA DE LA CREMA EN RATONES ALBINOS

- Crema base
- Solución salina
- Crema con extracto de Achiote

3.1.6 INFRAESTRUCTURA

- Laboratorio de farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 DISEÑO METODOLÓGICO

El presente trabajo es un estudio de investigación cuasi experimental ya que los animales de investigación no son asignados al azar más bien son grupos ya formados

3.2.2 NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

Este estudio es de tipo correlacional ya que se analizó una variable independiente (extracto etanólico) que afecta a la variable dependiente (actividad fotoprotectora). Se dividió en cuatro etapas.

Primera etapa: Obtención del extracto etanólico de semillas de *Bixa orellana* (achiote), evaluación de la irritación dérmica aguda del extracto etanólico e incorporación del extracto a una crema base.

Segunda etapa: Sobre la determinación del FPS por el método espectrofotométrico del producto patrón (Bahia superblock) y de las cremas elaboradas con el extracto etanólico de *Bixa orellana* (achiote).

Tercera etapa: Evaluación in vivo de la capacidad fotoprotectora y fotorreparadora de las cremas elaboradas con el extracto etanólico de *Bixa orellana* (achiote) y la crema patrón.

Cuarta etapa: Sobre el estudio de Irritación Primaria en Piel de ratones de la forma farmacéutica elaborada con el extracto etanólico de *Bixa orellana* (achiote) que mejor resultado presente en los ensayos de capacidad fotoprotectora, fotorreparadora y factor de protección solar (FPS).

3.2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.3.1 ENSAYO DE IRRITACIÓN DÉRMICA PRIMARIA DEL EXTRACTO AL 96% DE SEMILLAS DE *Bixa orellana* (ACHIOTE) EN RATONES ALBINOS

Diseño cuasiexperimental con postpruebas, múltiples grupos y múltiples mediciones

G: Grupo de 3 ratones albinos.

X: Aplicación directa sobre la piel, del extracto etanólico al 96% de semillas de *Bixa orellana* (achiote) disuelto en tween-80.

O: Observación de la aparición de eritema, edema, u otro tipo de signo de irritación como enrojecimiento o prurito.

G ₁	X ₁	X	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇
G ₂	X ₂	X	O ₈	O ₉	O ₁₀	O ₁₁	O ₁₂	O ₁₃	O ₁₄
G ₃	X ₃	X	O ₁₅	O ₁₆	O ₁₇	O ₁₈	O ₁₉	O ₂₀	O ₂₁
Tiempo de observación			30min	1 h	24 h	48 h	72 h	7dias	14dias

G₁: Grupo de 3 ratones albinos a los que se les aplicó 1.0 gr del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disueltos en tween-80.

G₂: Grupo de 3 ratones albinos a los que se les aplicó 3.0 gr del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disueltos en tween-80.

G₃: Grupo de 3 ratones albinos a los que se les aplicó 5.0 gr del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disueltos en tween-80.

X: Parte superior del lomo del ratón - CONTROL (sin aplicación).

X₁: Parte inferior del lomo del ratón. Se le aplicó 1.0 gr del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disueltos en tween-80.

X₂: Parte inferior del lomo del ratón. Se le aplicó 3.0 gr del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disueltos en tween-80.

X₃: Parte inferior del lomo del ratón. Se le aplicó 5.0 gr del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disueltos en tween-80.

O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆, O₇: Observación de la reacción dérmica después de la aplicación de 1.0 gr del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disueltos en tween-80.

O₈, O₉, O₁₀, O₁₁, O₁₂, O₁₃, O₁₄: Observación de la reacción dérmica después de la aplicación de 3.0 gr del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disueltos en tween-80.

O₁₅, O₁₆, O₁₇, O₁₈, O₁₉, O₂₀, O₂₁: Observación de la reacción dérmica después de la aplicación de 5.0 gr del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disueltos en tween-80.

3.2.3.2 CAPACIDAD FOTOPROTECTORA MEDIANTE LA VALORACIÓN DE CAMBIOS INFLAMATORIOS.

Diseño cuasiexperimental con postpruebas, múltiples grupos y múltiples mediciones

G: Grupo de 3 ratones albinos con lomo depilado.

X: Irradiación directa sobre el lomo depilado del ratón.

O: Observación cambios inflamatorios

T: Tratamiento con crema en piel de ratones

G ₁	T ₁	X	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄
G ₂	T ₂	X	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈
G ₃	T ₃	X	O ₉	O ₁₀	O ₁₁	O ₁₂
G ₄	T ₄	X	O ₁₃	O ₁₄	O ₁₅	O ₁₆
G ₅	...	X	O ₁₇	O ₁₈	O ₁₉	O ₂₀
G ₆	O ₂₁	O ₂₂	O ₂₃	O ₂₄
Tiempo de observación			4 horas	24 horas	48 horas	72 horas

G₁: Grupo de 3 ratones albinos con lomo depilado que recibieron tratamiento T₁

G₂: Grupo de 3 ratones albinos con lomo depilado que recibieron tratamiento T₂

G₃: Grupo de 3 ratones albinos con lomo depilado que recibieron tratamiento T₃

G₄: Grupo de 3 ratones albinos con lomo depilado que recibieron tratamiento T₄

G₅: Grupo de 3 ratones albinos con lomo depilado que no fueron tratados con ninguna crema y fueron expuestos a irradiación (Control positivo).

G₆: Grupo de 3 ratones albinos con lomo depilado que no fueron tratados con ninguna crema y no fueron irradiados (Control negativo).

T₁: Aplicación de la crema al 1.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) a ratones con lomo depilado del grupo G₁

T₂: Aplicación de la crema al 3.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) a ratones con lomo depilado del grupo G₂

T₃: Aplicación de la crema al 5.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) a ratones con lomo depilado del grupo G₃

T₄: Aplicación del producto patrón Bahía superblock 55 a ratones con lomo depilado del grupo G₄

X: Irradiación con luz ultravioleta al grupo

O₁, O₅, O₉, O₁₃, O₁₇, O₂₁: Observación cambios inflamatorios cutáneos a las 4h

O₂, O₆, O₁₀, O₁₄, O₁₈, O₂₂: Observación cambios inflamatorios cutáneos a las 24h

O₃, O₇, O₁₁, O₁₅, O₁₉, O₂₃: Observación cambios inflamatorios cutáneos a las 48h

O₄, O₈, O₁₂, O₁₆, O₂₀, O₂₄: Observación cambios inflamatorios cutáneos a las 72h

... : Ausencia de estímulo.

3.2.3.3 CAPACIDAD FOTORREPARADORA MEDIANTE VALORACIÓN DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS CUTÁNEOS.

Diseño cuasiexperimental con postprueba, múltiples grupos y una sola medición

G: Grupo de 3 ratones albinos con lomo depilado.

X: Irradiación directa sobre el lomo depilado del ratón.

T: Tratamiento con crema en piel de ratones.

O: Observación cambios morfológicos cutáneos después de cinco días de tratamiento con las cremas.

G ₁	X	T ₁	O ₁
G ₂	X	T ₂	O ₂
G ₃	X	T ₃	O ₃
G ₄	X	T ₄	O ₄
G ₅	X	...	O ₅
G ₆	...	T ₅	O ₆

G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆: 3 ratones albinos con lomo depilado

X : Irradiación con luz ultravioleta (estímulo)

T₁ : Aplicación de la crema al 1.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) a ratones con lomo depilado del grupo G₁ durante 5 días después del estímulo.

T₂ : Aplicación de la crema al 3.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) a ratones con lomo depilado del grupo G₂ durante 5 días después del estímulo.

T₃ : Aplicación de la crema al 5.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) a ratones con lomo depilado del grupo G₃ durante 5 días después del estímulo.

T₄ : Aplicación de la crema patrón Bahia superblock a ratones con lomo depilado del grupo G₄ durante 5 días después del estímulo.

T₅ : Aplicación de la crema base a ratones con lomo depilado del grupo G₆ durante 5 días después del estímulo.

X₅ : Irradiación con luz ultravioleta al grupo G₅

O₁: Observación de cambios morfológicos cutáneos después de 5 días de aplicación de la crema al 1.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote).

O₂: Observación de cambios morfológicos cutáneos después de 5 días aplicación de la crema al 3.0% del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote).

O₃: Observación de cambios morfológicos cutáneos después de 5 días de aplicación de la crema al 5.0% del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote).

O₄: Observación de cambios morfológicos cutáneos después de 5 días de aplicación con el producto patrón.

O₅: Observación de cambios morfológicos cutáneos después de la irradiación ultravioleta sin aplicación de ninguna crema (control positivo).

O₆: Observación de cambios morfológicos cutáneos sin irradiación y con aplicación tópica de la crema base (control negativo)

.... : Ausencia de estímulo

3.2.3.4 DETERMINACIÓN IN VITRO DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS) DE LAS CREMAS CON EXTRACTO ETANÓLICO DE *Bixa orellana* (ACHIOTE).

Diseño cuasiexperimental con múltiples grupos y una sola medición

G: Solución etanólica de las cremas a base del extracto seco de *Bixa orellana* (achiote), en una concentración determinada.

X: Condiciones a longitudes de onda establecidas nm.

O: Medición de las absorbancias (lectura en el espectrofotómetro).

G ₁	X ₁	O ₁
G ₁	X ₂	O ₂
G ₁	X ₃	O ₃
G ₁	X ₄	O ₄
G ₁	X ₅	O ₅
G ₁	X ₆	O ₆
G ₁	X ₇	O ₇
G ₂	X ₈	O ₈
G ₂	X ₉	O ₉
G ₂	X ₁₀	O ₁₀
G ₂	X ₁₁	O ₁₁
G ₂	X ₁₂	O ₁₂
G ₂	X ₁₃	O ₁₃
G ₂	X ₁₄	O ₁₄
G ₃	X ₁₅	O ₁₅
G ₃	X ₁₆	O ₁₆
G ₃	X ₁₇	O ₁₇
G ₃	X ₁₈	O ₁₈
G ₃	X ₁₉	O ₁₉
G ₃	X ₂₀	O ₂₀
G ₃	X ₂₁	O ₂₁

G₁: Solución etanólica a base de la crema al 1.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de *Bixa orellana* (achiote), en una concentración de 0,2 mg/mL.

G₂: Solución etanólica a base de la crema al 3.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de *Bixa orellana* (achiote), en una concentración de 0,2 mg/mL.

G₃: Solución etanólica a base de la crema al 5.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de *Bixa orellana* (achiote), en una concentración de 0,2 mg/mL.

X₁: Longitud de onda a 290 nm.

X₂: Longitud de onda a 295 nm.

X₃: Longitud de onda a 300 nm.

X₄: Longitud de onda a 305 nm.

X₅: Longitud de onda a 310 nm.

X₆: Longitud de onda a 315 nm.

X₇: Longitud de onda a 320 nm.

X₈: Longitud de onda a 290 nm.

X₉: Longitud de onda a 295 nm.

X₁₀: Longitud de onda a 300 nm.

X₁₁: Longitud de onda a 305 nm.

X₁₂: Longitud de onda a 310 nm.

X₁₃: Longitud de onda a 315 nm.

X₁₄: Longitud de onda a 320 nm.

X₁₅: Longitud de onda a 290 nm.

X₁₆: Longitud de onda a 295 nm.

X₁₇: Longitud de onda a 300 nm.

X₁₈: Longitud de onda a 305 nm.

X₁₉: Longitud de onda a 310 nm.

X₂₀: Longitud de onda a 315 nm.

X₂₁: Longitud de onda a 320 nm.

O₁: Lectura espectrofotométrica a 290 nm de la crema al 1.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₂: Lectura espectrofotométrica a 295 nm de la crema al 1.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₃: Lectura espectrofotométrica a 300 nm de la crema al 1.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₄: Lectura espectrofotométrica a 305 nm de la crema al 1.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₅: Lectura espectrofotométrica a 310 nm de la crema al 1.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₆: Lectura espectrofotométrica a 315 nm de la crema al 1.0 % con extracto seco de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₇: Lectura espectrofotométrica a 320 nm de la crema al 1.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₈: Lectura espectrofotométrica a 290 nm de la crema al 3.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₉: Lectura espectrofotométrica a 295 nm de la crema al 3.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₀: Lectura espectrofotométrica a 300 nm de la crema al 3.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₁: Lectura espectrofotométrica a 305 nm de la crema al 3.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₂: Lectura espectrofotométrica a 310 nm de la crema al 3.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₃: Lectura espectrofotométrica a 315 nm de la crema al 3.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₄: Lectura espectrofotométrica a 320 nm de la crema al 3.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₅: Lectura espectrofotométrica a 290 nm de la crema al 5.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₆: Lectura espectrofotométrica a 295 nm de la crema al 5.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₇: Lectura espectrofotométrica a 300 nm de la crema al 5.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₈: Lectura espectrofotométrica a 305 nm de la crema al 5.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₁₉: Lectura espectrofotométrica a 310 nm de la crema al 5.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₂₀: Lectura espectrofotométrica a 315 nm de la crema al 5.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

O₂₁: Lectura espectrofotométrica a 320 nm de la crema al 5.0 % de extracto seco de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).

Nota: La pruebas se realizaron por triplicado.

3.2.3.5 ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICOQUÍMICAS DE LA CREMA CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE *Bixa orellana* (achiote)

Diseño cuasiexperimental con postprueba, múltiples grupos y múltiples mediciones

G ₁	X ₁	X ₂	X ₃	O ₁	O ₂
G ₂	X ₁	X ₂	X ₃	O ₃	O ₄
G ₃	X ₁	X ₂	X ₃	O ₅	O ₆
Tiempo de observación				1 día	14 días

G₁: Crema al 1% con el extracto etanólico de semillas de *Bixa orellana* (achiote).

G₂: Crema al 3% con el extracto etanólico de semillas de *Bixa orellana* (achiote).

G₃: Crema al 5% con el extracto etanólico de semillas de *Bixa orellana* (achiote).

X₁: Análisis de característica fisicoquímica de pH de las cremas con el extracto etanólico al 96% de *Bixa orellana* (achiote).

X₂: Análisis de característica fisicoquímica de extensibilidad de las cremas con el extracto etanólico al 96% de *Bixa orellana* (achiote).

X₃: Análisis de características organolépticas (aspecto, textura, consistencia, color y olor) de las cremas con el extracto etanólico al 96% de *Bixa orellana* (achiote) del grupo G₃.

O₁, O₃, O₅: Observación de características organolépticas como aspecto textura, consistencia, color y olor al primer día de preparación.

O₂, O₄, O₆: Observación de características organolépticas como aspecto textura, consistencia, color y olor a los catorce días de preparación.

3.2.3.6 ENSAYO DE IRRITACIÓN DÉRMICA PRIMARIA DE LA CREMA CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE *Bixa orellana* (ACHIOTE)

Diseño cuasiexperimental con postprueba, múltiples grupos y múltiples mediciones

G: Grupo de 3 ratones albinos.

X: Aplicación directa sobre la piel de la crema a evaluar

O: Observación de la aparición de eritema, edema, u otro tipo de signo de irritación como enrojecimiento, prurito o aumento de temperatura corporal.

G ₁	X ₁	X	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇
G ₂	X ₂	X	O ₈	O ₉	O ₁₀	O ₁₁	O ₁₂	O ₁₃	O ₁₄
Tiempo de observación			30min	1 h	24 h	48 h	72 h	7días	14días

G₁: Grupo de 3 ratones albinos a los que se les aplicó 1.0 gr de la crema con extracto etanólico al 96% de semillas de ***Bixa orellana***

G₂: Grupo de 3 ratones albinos a los que se les aplicó 1.0 gr de crema base

X: Parte superior del lomo del ratón - CONTROL (sin aplicación).

X₁: Parte inferior del lomo del ratón. Se le aplicó 1.0 gr de la crema 1% con extracto etanólico al 96% de semillas de ***Bixa orellana***

X₂: Parte inferior del lomo del ratón. Se le aplicó 1.0 gr de crema base.

O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆, O₇: Observación de la reacción dérmica después de la aplicación de 1.0 gr de la crema con extracto etanólico al 96% de semillas de ***Bixa orellana***

O₈, O₉, O₁₀, O₁₁, O₁₂, O₁₃, O₁₄: Observación de la reacción dérmica después de la aplicación de 1.0 gr de crema base.

3.3 VARIABLES

CUADRO GENERAL DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES

3.3.1 VARIABLE IMPLICADAS

3.3.1.1 VARIABLE INDEPENDIENTE

VARIABLE	INDICADOR	SUB INDICADOR	NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCESO DE MEDICIÓN	EXPRESIÓN FINAL
Extracto etanólico al 96% de Bixa orellana (achiote)	Concentración: cantidad de extracto etanólico seco al 96% de Bixa orellana (achiote) incorporado en tween 80 y/o crema base. A las concentraciones de 1.0%, 3.0% y 5.0%		cuantitativa	directa	razón	Balanza analítica de sensibilidad 0.0001g	Se procedió a pesar el extracto etanólico seco al 96% de Bixa orellana (achiote), luego se realizó su dilución en tween-80(mL) y/o crema base para obtener concentraciones al 1%, 3% y 5%.	%P/P

3.3.1.2 VARIABLE DEPENDIENTES

VARIABLE	INDICADOR	SUB INDICADOR	NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCESO DE MEDICIÓN	EXPRESION FINAL
Capacidad fotoprotectora in vivo	<u>Valoración de cambios inflamatorios cutáneos:</u> es la estimación visual macroscópica de del grado de edema y eritema formados en la zonas expuestas de los animales después de la irradiación con luz UV	Eritema: reacción inflamatoria aguda de la piel, causado por una exposición aguda. El rasgo que lo caracteriza es un enrojecimiento de la piel (4).	cualitativa	directa	ordinal	Estimación visual	Después de la irradiación con luz UV se esperó hasta que aparezca el primer eritema y edema después del tiempo de aparición estos parámetros se evaluarán a las 4,24,48,y72 horas	0= no eritema 1= definido(rojo apreciable) 2= moderado (rojo) 3=intenso (rojo intenso) 4= severo (muy enrojecido-granate)
		Edema: acumulación de líquido en el espacio tisular intercelular o intersticial y también en la cavidades del organismo. Esta acumulación de líquido da lugar a una hinchazón de la zona fácilmente apreciable (36).	cualitativa	directa	ordinal	Estimación visual		0= no edema 1=observable (desnivel definido) 2=moderado (desnivel aprox 1mm) 3=severo (desnivel mayor de 1mm)
Capacidad fotorreparadora in vivo	<u>Valoración de cambios morfológicos cutáneos:</u> es el análisis microscópico de las patologías producidas en el epitelio de la zona expuesta de animales irradiados	Hiperqueratosis: incremento de la longitud del estrato corneo (84).	cualitativa	directa	ordinal	microscópica	Se determinaron parámetros histopatológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Intensa • Moderada • Leve • Escasa • Ausente

VARIABLE	INDICADOR	SUB INDICADOR	NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCESO DE MEDICIÓN	EXPRESION FINAL
Capacidad fotorreparadora in vivo	<u>Valoración de cambios morfológicos cutáneos:</u> es el análisis microscópico de las patologías producidas en el epitelio de la zona expuesta de animales irradiados	Espongiosis: edema intraepidérmico (84).	cualitativa	directa	ordinal	microscópica	Se determinaron parámetros histopatológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Intensa • Moderada • Leve • Escasa • Ausente
		Úlceras: lesión cutánea localizada que implica pérdida total de la epidermis (84).	cualitativa	directa	ordinal	microscópica		<ul style="list-style-type: none"> • Grado 1 • Grado 2 • Grado 3 • Ausente
		Congestión: aumento de la cantidad de sangre presente en vasos (84).	cualitativa	directa	ordinal	microscópica		<ul style="list-style-type: none"> • Intensa • Moderada • Leve • Escasa • Ausente
		Anexos: estado de los anexos después de la radiación con luz UV (84).	cualitativa	directa	ordinal	microscópica		<ul style="list-style-type: none"> • Normales • Inconstante • Disminuidos
		Costra: Masa sólida adherida a la piel y que acaba desprendiéndose (84).	cualitativa	directa	nominal	microscópica		<ul style="list-style-type: none"> • Ausente • Presente
		Hiperplasia: Aumento de la cantidad de células presentes en el tejido epitelial (84).	cualitativa	directa	nominal	microscópica		<ul style="list-style-type: none"> • Ausente • Presente

VARIABLE	INDICADOR	SUB INDICADOR	NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCESO DE MEDICIÓN	EXPRESION FINAL
Capacidad fotoprotectora in vitro	Determinación in vitro del FPS: es la determinación espectrofotométrica del FPS que presentaran las cremas al 1%,3% y 5% con el extracto etanólico de Bixa orellana (achiote) (36).	Factor de protección solar (FPS): es el factor o número que indica las veces que el fotoprotector aumenta la capacidad de defensa natural de la piel frente al eritema en función al tiempo (36).	cualitativa	indirecta	ordinal	espectrofotométrica	Se calculó a través de la ecuación matemática para la determinación del FPS in vitro	De 2-6= protección baja De 8-12= protección media De 15-25= protección alta De 30-50= protección muy alta Mayor a 50= protección ultra 0
Crema con extracto etanólico de Bixa orellana (achiote)	Análisis de características organolépticas	Aspecto: característica física para apreciar la homogeneidad de la formulación	Cualitativa	Directa	nominal	Estimación visual	Se realizó el análisis organoléptico (estimación visual y olfativa) de las cremas con extracto etanólico de Bixa orellana (achiote) al 1%, 3% y 5% al primer y catorceavo día de su preparación	<ul style="list-style-type: none"> • Homogéneo • No homogéneo
		Textura: característica física para diferenciar la fluidez de la formulación	Cualitativa	Directa	nominal	Estimación visual		<ul style="list-style-type: none"> • Cremosa • Fluida
		Consistencia: característica física de la formulación que resiste a deformarse	Cualitativa	Directa	nominal	Estimación visual		<ul style="list-style-type: none"> • Ligera • Densa
		Característica física para diferenciar la intensidad y tonalidad de la formulación	Cualitativa	Directa	nominal	Estimación visual		<ul style="list-style-type: none"> • Blanco • Ligeramente amarillo • Amarillo claro • Amarillo
		Olor: característica física para determinar el aroma de la formulación	Cualitativa	Directa	nominal	Estimación olfativa		<ul style="list-style-type: none"> • Sin olor • Agradable • Desagradable

VARIABLE	INDICADOR	SUB INDICADOR	NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCESO DE MEDICIÓN	EXPRESION FINAL
Toxicidad dérmica	Irritación dérmica primaria	Eritema: reacción inflamatoria aguda de la piel, causado por una exposición aguda. El rasgo que lo caracteriza es un enrojecimiento de la piel (3).	cualitativa	directa	ordinal	Estimación visual Grado de eritema	Se asignó al eritema y al edema un valor de 0 a 4 de acuerdo al grado que presentó. Una vez asignado los valores se obtuvo un valor final que caracteriza a la sustancia a estudiar denominada índice de irritación primaria (IIP)	<ul style="list-style-type: none"> • 0= no irritante • 0.1-0.9= ligeramente irritante • 2.0-5.0= moderadamente irritante • 5.1-8.0= severa irritación
		Edema: acumulación de líquido en el espacio tisular intercelular o intersticial y también en la cavidades del organismo. Esta acumulación de líquido da lugar a una hinchazón de la zona fácilmente apreciable (66).	cualitativa	directa	ordinal	Estimación visual Grado de eritema		

3.3.2 VARIABLES NO IMPLICADAS

3.3.2.1 VARIABLES INTERVINIENTES

VARIABLE	INDICADOR	NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	EXPRESION FINAL
Animales de experimentación	Edad: tiempo transcurrido a partir del nacimiento	Cuantitativa	Directa	Ordinal	2 meses 3 meses
	Sexo: diferencia entre masculino y femenino	cualitativa	directa	nominal	Macho Hembra

3.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

3.4.1 DE LA SEMILLA DE *Bixa orellana* (ACHIOTE)

Inclusión

- Semillas maduras
- Semillas que se encuentren enteras

Exclusión

- No se usaron hojas o tallos
- No se usaron semillas que no estén maduras

3.4.2 DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Inclusión

- Ratones albinos hembra *Mus musculus* cepa Balb/c/CNPB
- Peso promedio de 30gr
- De 2 a 3 meses de edad
- Ratones sanos

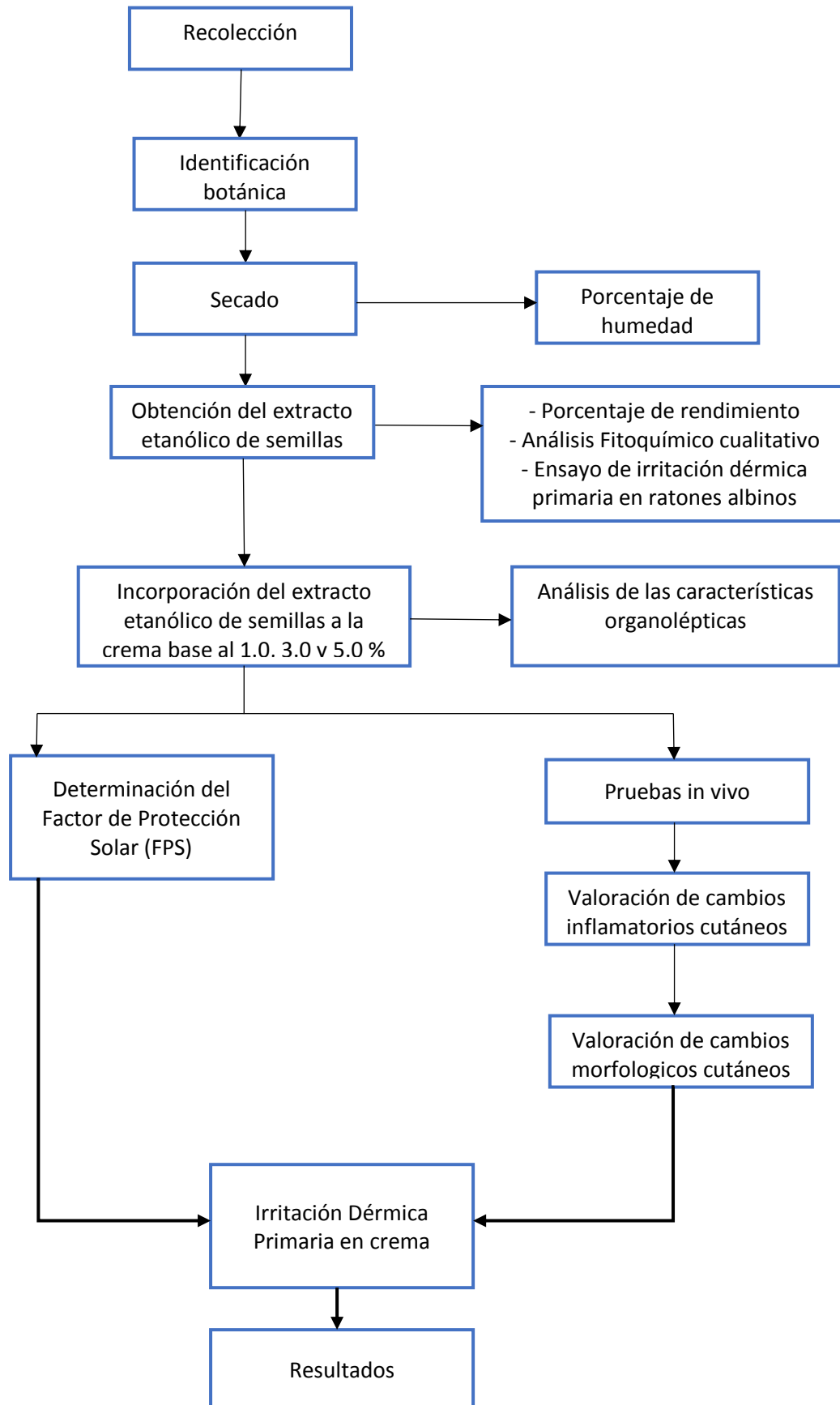
Exclusión

- No se tomaran en cuenta animales que previamente fueron manipulados para otras pruebas.
- No se tomaran en cuenta animales que presenten algún tipo de infección o irritación dérmica.

3.5 PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

Se recolectaron las semillas de *Bixa orellana* (achiote), se determinó el porcentaje de humedad, posteriormente se obtuvo el extracto etanólico al 96% de las semillas y se procedió con el análisis fitoquímico de la misma. Se realizaron ensayos de irritación dérmica primaria en ratones albinos con el extracto obtenido. Se elaboró una crema base a la que posteriormente se incorporó el extracto de semillas en concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0%; luego se realizó el análisis de las características organolépticas y fisicoquímicas. Seguidamente se calculó el FPS tanto de las cremas preparadas con el extracto etanólico y la crema patrón. Se realizaron las pruebas de la capacidad fotoprotectoras y fotorreparadoras in vivo; entonces primero se evaluaron los cambios inflamatorios determinados por eritema y edema, posteriormente se evaluaron los cambios morfológicos cutáneos determinados por hiperqueratosis, espongirosis, úlceras, congestión, anexos, costras e hiperplasia. Finalmente se realizó el ensayo de irritación dérmica primaria de la crema base y la crema con extracto.

Esquema N° 01: Procedimiento de investigación



Fuente: Elaboración propia

3.5.1 OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Bixa orellana* (ACHIOTE)

3.5.1.1 RECOLECCIÓN:

Las semillas de *Bixa orellana* (achiote) fueron recolectadas en el distrito de Santa María de la provincia de la Convención, la cual está ubicada en el departamento de Cusco. Situada a una altura de 1188 msnm.

3.5.1.2 SELECCIÓN Y SECADO

Las semillas recolectadas fueron cuidadosamente seleccionadas, tomando en cuenta que estén completamente enteras y libres de partículas como insectos y hongos. El secado se realizó a temperatura ambiente en un espacio fresco seco y alejado del sol.

3.5.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS DE *Bixa orellana* (ACHIOTE)

3.5.2.1 PORCENTAJE DE HUMEDAD

Para determinar el porcentaje de humedad se utilizó el método Gravimétrico determinando la pérdida de agua por desecación en una estufa. La determinación del porcentaje de humedad se realizó por triplicado, en placas Petri con 10 gramos aproximadamente de muestra seleccionada, las cuales fueron introducidos a una estufa a una temperatura de 50°C por 24 horas. Luego se determinó el porcentaje de humedad mediante la siguiente ecuación (104)(105).

$$\% H = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

- %H: Porcentaje de humedad
- Pi: Peso de muestra inicial
- Pf: Peso de muestra final

3.5.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO SEMILLAS DE ACHIOTE

3.5.3.1 MACERACIÓN

Para la obtención del extracto etanólico seco se usó el método de maceración simple, en el cual el material vegetal está en contacto con un volumen de solvente durante un tiempo determinado. Las semillas de *Bixa orellana* (achiote) se sometieron a maceración con etanol al 96% (73) , con agitación constante por un período de 15 días.

3.5.3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO

El extracto etanólico se filtró, trasvaso y concentro por evaporación del solvente en rotavapor, finalmente se obtuvo un extracto seco.

3.5.4 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE LAS SEMILLAS DE ACHIOTE

El porcentaje de rendimiento del extracto etanólico al 96% de **Bixa orellana** (achiote), se calculó por la siguiente expresión:

$$\%EEt = \frac{PF}{PI} \times 100$$

Donde:

- % EEt = Porcentaje de extracto etanólico de semillas al 96%
- PF = Peso final de extracto etanólico de semillas al 96%
- P I= Peso inicial de semillas de achiote

3.5.5 MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS SEMILLAS DE ACHIOTE

La marcha fitoquímica del extracto obtenido se realizó aplicando métodos y técnicas estandarizadas. Mediante reacciones de reconocimiento, procedimientos químicos, basados en colorimetría y precipitación se determinó la presencia de alcaloides, glucósidos, aminoácidos, flavonoides, compuestos fenólicos, etc. (106)

3.5.6 ENSAYO DE IRRITACIÓN DÉRMICA PRIMARIA DEL EXTRACTO DE SEMILLAS DE **Bixa orellana** (ACHIOTE) EN RATONES ALBINOS

Para este ensayo se utilizaron ratones albinos de la especie *Mus musculus*, cepa Balb/c/CNPB. Quienes pasaron por un periodo de aclimatación de 15 días previos al ensayo y fueron mantenidos en jaulas metálicas. El agua y el alimento se administraron “ad libitum”.

Los animales de experimentación fueron divididos en 3 grupos de 3 ratones cada grupo (9 ratones). Se utilizaron los tres ratones albinos de cada grupo para el ensayo de la sustancia problema es decir el extracto etanólico al 96% de las semillas de **Bixa orellana** (achiote) al 1.0, 3.0 y 5.0%.

Cada animal de ensayo poseía una parte intacta de la piel que se utilizó como control y otra zona contigua como lugar de aplicación del extracto. Cada sitio de aplicación se trató con 500 uL de la sustancia disuelta en tween-80. La sustancia a ensayar se mantuvo en contacto con la piel mediante un apósito por 4 horas.

Las observaciones fueron realizadas a los 30 min, 1, 24, 48 y 72 horas, 7 y 14 días después de remover el apósito.

3.5.6.1 MÉTODO DE EVALUACIÓN DE LA IRRITACIÓN

La escala que se usó para evaluar la Irritación Dérmica Primaria (107)(108) , se presenta en la Tabla N° 04 para cada uno de los animales, los valores de eritema y edema durante las 72 horas del periodo de observación se suman y se dividen entre 5 (Numero de observaciones realizadas) para obtener un valor individual del índice de Irritación Primaria (VIP). Este índice se determinó calculando el promedio de los valores

de irritación para todos los animales y se usó para obtener el índice de Irritación Primaria (IIP) de la sustancia a ensayar mostrada en la Tabla N°05. Basado en las observaciones realizadas durante las 72 horas; a las sustancias a hallar se le asignó un valor de acuerdo a la escala presentada en la Tabla N° 06.

Ecuación para determinar los VIP e IIP para “n” animales de experimentación.

$$VIP_1 = \Sigma (\text{valores de eritema} + \text{valores de edema}) / n$$

$$VIP_2 = \Sigma (\text{valores de eritema} + \text{valores de edema}) / n$$

$$VIP_3 = \Sigma (\text{valores de eritema} + \text{valores de edema}) / n$$

$$VIP_{(n)} = \Sigma (\text{valores de eritema} + \text{valores de edema}) / n$$

$$IIP = \Sigma (VIP_1 + VIP_2 + VIP_3 + VIP_{(n)}) / (n)$$

Donde:

VIP = Valor individual del índice de irritación primaria.

IIP = Índice de irritación primaria.

n = Número de observaciones realizadas.

(n) = Número de animales de experimentación.

Tabla N° 04: Irritación Dérmica Aguda en Ratones

Escala de valorización de la irritación dérmica primaria
(Técnica de Draize*)

FORMACIÓN DE ERITEMA	VALOR
Ausencia de eritema	0
Eritema muy ligero (casi imperceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a severo	3
Eritema muy severo(rojo remolacha)/(lesiones profundas)	4
Máximo posible	4
FORMACIÓN DE EDEMA	VALOR
Ausencia de edema	0
Edema muy ligero (casi imperceptible)	1
Edema ligero (borde del área bien definidos por un levantamiento definitivo)	2
Edema moderado (levantamiento aproximado 1mm)	3
Edema severo (levantamiento de más de 1 mm y extendiéndose más allá del área de exposición)	4
Máximo posible	4
Fuente: Draize et al., 1994.(109)	

Tabla N° 05: Clasificación de las sustancias a ensayar

DESCRIPCIÓN	INDICE DE IRRITACIÓN PRIMARIA (IIP)
No irritante	0.0
Ligeramente irritante	0.1 - 1.9
Moderadamente irritante	2.0 - 5.0
Severa irritación	5.1 – 8.0
Fuente: Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act. Compliance/Enforcement Guidance Manual (FIFRA), 1990.(110)	

El IIP se calculó usando las observaciones de 72 horas.

Tabla N° 06: Categorías Tóxicas de la Irritación Dérmica

CATEGORIA TÓXICA	CRITERIO
I	Corrosivo
II	Severa irritación a las 72 horas
III	Moderada irritación a las 72 Horas
IV	No irritante, mediana o ligera irritación a las 72 horas
Fuente: Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act. Compliance/Enforcement Guidance Manual (FIFRA), 1990	

3.5.6.2 ADMINISTRACIÓN DE LA SUSTANCIA A ENSAYAR

Se utilizaron 9 ratones albinos que fueron puestos en un período de aclimatación durante 15 días (111). La superficie del lomo de cada animal fue depilado un 48 horas antes del tratamiento, se obtuvo un área de exposición de 8 cm² aproximadamente.

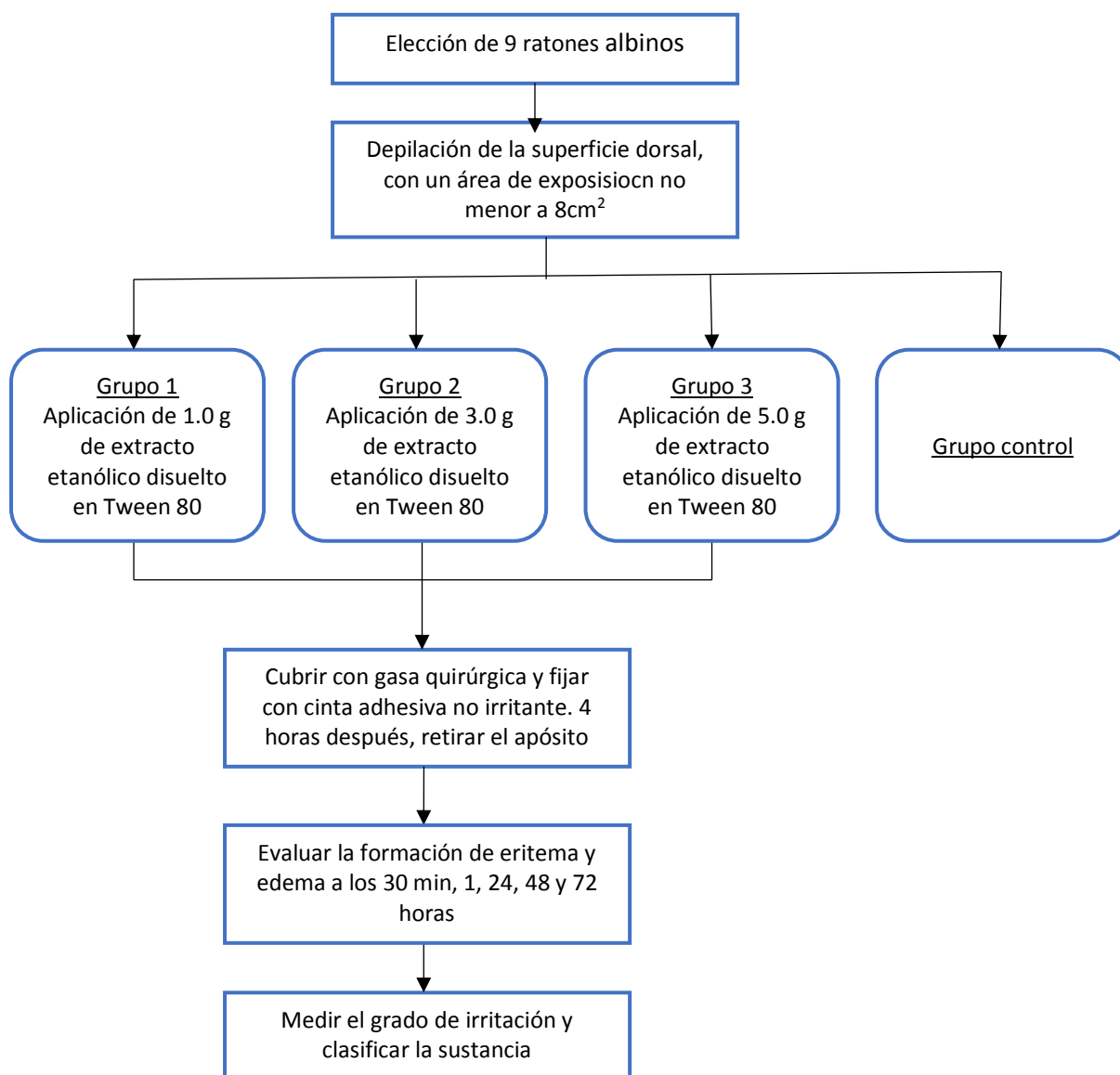
Se usaron animales que no presentaron ninguna lesión o irritación dérmica. En el área depilada, la parte inferior fue lugar de aplicación de la sustancia ensayada y la otra superior contigua que fue el control. Los animales fueron divididos en 3 grupos de 3 ratones cada grupo fue tratado con concentraciones de 1.0%, 3.0% y 5.0 % del extracto etanólico al 96% de semillas de **Bixa orellana** (achiote) disuelto en Tween-80 para cada grupo de ensayo respectivamente.

Luego de la aplicación del extracto etanólico al 96% al 1.0%, 3.0% y 5.0 %, se procedió a cubrir con una gasa quirúrgica de 2 x 2 cm cada lugar de aplicación. Cada apósito se fijó con cinta adhesiva no irritante. Los animales de experimentación fueron observados por un periodo de 4 horas para asegurar la absorción del extracto disuelto en Tween 80.

3.5.6.3 REMOCIÓN DE LA SUSTANCIA A ENSAYAR

Después de 4 horas se retiró el apósito y los sitios tratados se limpiaron cuidadosamente con suero fisiológico, se usó algodón estéril para remover todo el material posible. Las observaciones se hicieron a los 30 min, 1 h, 24 h, 48 h y 72 h, para evaluar la formación de eritema y/o edema (108).

Esquema N°02: Ensayo de Irritación Dérmica aguda



Fuente: Elaboración propia

3.5.7 INCORPORACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96%, EN LA FORMA FARMACÉUTICA – CREMA BASE, A CONCENTRACIONES DE 1.0%, 3.0% Y 5.0 % P/P Y ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICOQUÍMICAS.

Para la incorporación del extracto seco etanólico de semillas de achiote en una crema base se realizaron algunos controles descritos en literatura para este tipo de forma farmacéutica, con la finalidad de determinar si su incorporación fue convenientemente.

Características organolépticas:

Las cremas deben presentar aspecto homogéneo, color y olor agradable o por lo menos aceptable y textura suave al tacto.

Una vez elaboradas las cremas se observaron a diferentes intervalos de tiempo (14 días) con la finalidad de examinar el aspecto, textura, consistencia, color y olor.

Características fisicoquímicas:

Determinación de pH:

Se midió en pH-metro previamente calibrado con soluciones tampón de pH 4 y 7. Al sacar el electrodo de cada tampón se lavó con agua destilada y se secó con papel filtro. Posteriormente se sumergió el electrodo limpio a las muestras, se homogenizó y determinó el pH.

Determinación de la extensibilidad:

Se midió utilizando dos placas Petri. Se situó la placa inferior sobre una hoja de papel milimetrado a la que se le trazaron diagonales. Se colocó una muestra de 1 g sobre el punto de intersección. Se ubicó la placa superior durante 1 minuto y se tomaron los valores de los radios formados. El área de extensibilidad (AE) se calculó según la siguiente expresión:

$$AE = \pi (rp)^2$$

Dónde:

rp: Radio promedio de las 2 mediciones (mm²)

Formulación:

La formulación e insumos utilizados fue proveida por el fabricante Cosphatech- Peru. Se utilizó la formula N° K140401. En la preparación de las cremas se aplicaron técnicas tradicionales de homogenización e incorporación mecánica del extracto.

FORMULACIÓN

Fase	Insumos	Descripción	%
A	Agua	-	c.s.p 100g
B	PolybaseCrystal G/AE	Estearato de glicerilo, Alcohol cetearílico, Ácido esteárico, Cocoil Glutamato de Sodio.	3
	Polymol 812	Triglicérido Caprílico / Caprico	3
	Polymol CTV	Oleato de Decilo	3
C	Salinip	Fenoxietanol, Metil parabeno, Etil parabeno, Butil parabeno, Isobutil parabeno	11
D	Rheosol AVC	Acrilamida / Copolímero De Acrilato De Sodio, aceites y ceras minerales y Alcohol de tridecilo	4
E	Extracto etanólico de semillas de Bixa orellana	-	1 (3,5)

Fuente: Formula N° K140401 - Cosphatech Perú

Después de la incorporación del extracto etanólico al 96% de las semillas a la crema base a las concentraciones de 1.0, 3.0 y 5.0%; se realizó el análisis organoléptico.

3.5.8 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS) DE LAS CREMAS ELABORADAS CON EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE SEMILLAS DE **Bixa orellana** (ACHIOTE) Y LA CREMA PATRÓN

Para la determinación del FPS del producto comercial y de las cremas a base del extracto etanólico de semillas de **Bixa orellana** (achiote) se usó el método in vitro espectrofotométrico desarrollado por Mansur (112). Este método mide las absorbancias de una solución a varias longitudes de onda de 290 - 320nm.

3.5.8.1 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS)

El análisis espectrofotométrico es parte de la metodología de comprobación de FPS in vitro descrita por Sayre y utilizada por Mansur en 1986 (112) (113) , por poseer buena correlación con los resultados obtenidos en los análisis in vivo, para la misma finalidad, para los productos con filtros orgánicos, donde la concentración final es de 0.2mg/mL.

En la lectura se usó el etanol como blanco, las muestras fueron medidas a longitudes de onda entre 290nm a 320nm. El FPS fue calculado con la fórmula detallada a continuación.

a. CÁLCULO DEL FPS

$$FPS = FC \cdot \sum_{320}^{290} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

- FC : Factor de correlación (igual a 10) determinado en función a dos lociones fotoprotectoras de FPS conocidos, de semejante manera a una loción que contiene 8% de Homosalato de FPS igual a 4.
- EE (λ) : Efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ .
- I(λ) : Intensidad del sol en la longitud de onda λ .
- Abs (λ) : Absorbancia de la solución en la longitud de onda

Los valores del efecto eritemogénico (EE) versus la intensidad de la radiación (I) pueden verificarse, en la tabla N° 07, para cada longitud de onda usada en los análisis y fueron obtenidos por Sayre en 1979.

Tabla N° 07: Relación entre el Efecto eritemogénico (EE) versus la Intensidad de Radiación (I) conforme a la Longitud de Onda (A)

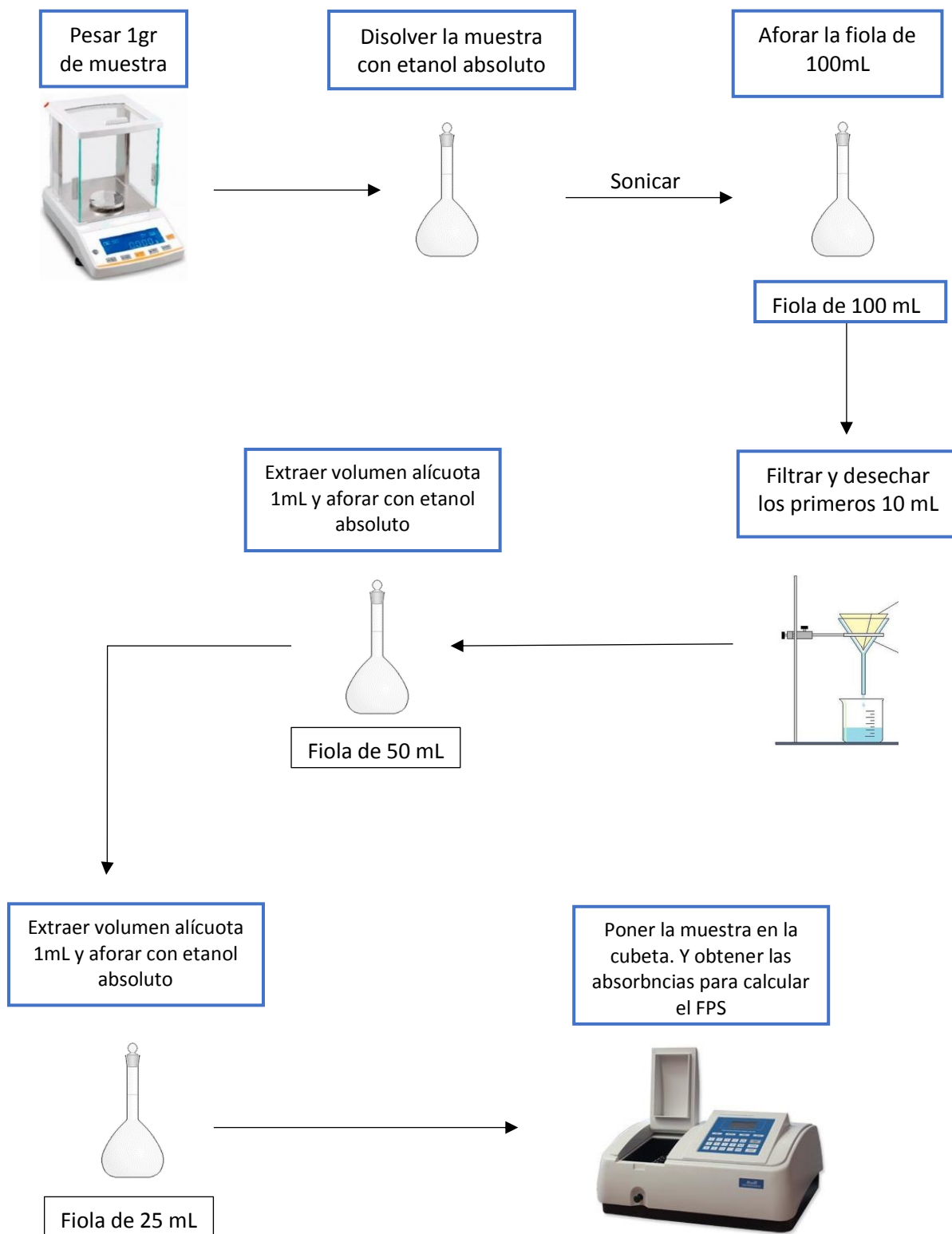
$\Lambda(\text{nm})$	EE x I
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180

Fuente: Sayre, 1979(113)

PROCEDIMIENTO: Tanto la crema comercial como las cremas elaboradas al 1.0, 3.0 y 5.0 % del extracto etanólico de semillas de **Bixa orellana** (achiote) siguieron el mismo procedimiento.

Se peso 1 gr de muestra en una fiola de 100 mL, conteniendo cerca de 30 mL de etanol para solubilizar la sustancia, sonicar por periodo de 5 min y luego aforar el volumen con el mismo solvente, una vez homogenizado se procedio a filtrar desechandose los 10 primeros mL, y pipetear una alícuota de 1,0 mL, transferir a una fiola de 50 mL, aforar con el reactivo etanol absoluto, mezclar, volver a pipetear una alícuota de 1,0mL y transferir a una fiola de 25 mL, enrasando con el mismo solvente y sacar la muestra a la cubeta de cuarzo, para proceder con las corridas respectivas con el espectrofotómetro previamente calibrado a las longitudes de onda.

Esquema N°03: Determinación del factor de protección solar (FPS)



Fuente: Elaboración propia

3.5.9 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA EN RATONES ALBINOS

La evaluación de la capacidad fotoprotectora *in vivo* se realizó a través de la valoración de cambios inflamatorios cutáneos.

3.5.9.1 VALORACIÓN DE CAMBIOS INFLAMATORIOS CUTÁNEOS

Para el estudio *in vivo* se emplearon animales de experimentación de la especie *Mus musculus* cepa Balb/c/CNPB, es uno de los modelos más usados en el campo de la fotobiología, ya que la mayoría de las respuestas cutáneas frente a la RUV aguda o crónica que se observan, son comparables a las que presenta el ser humano. Además, los mecanismos desencadenantes también parecen los mismos (114). La experimentación con este tipo de animales ofrece ciertas ventajas: La diferencia de espesor de la piel, que favorece la mayor penetrabilidad de la RUV, la pérdida de pigmentación y un ciclo de vida corto determinan que procesos como el fotoenvejecimiento o fotocarcinogénesis, que en el hombre tardan décadas en desarrollarse, en este modelo experimental ocurran mucho antes.

Se usaron ratones hembras de la cepa Balb/c/CNPB sanos, con peso promedio de 30 gramos y de 2 - 3 meses de edad. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 20 - 25°C, adaptados a ciclos de luz/oscuridad de doce horas diarias. El período de aclimatación previo al proceso experimental fue de 15 días (111).

Se depilaron a los animales 48 horas antes del tratamiento (42), obteniendo un área aproximada de 8cm² sobre la zona dorsal del animal.

Se aplicó el producto (crema con extracto etanólico al 96%) y se extendió uniformemente con ayuda de guantes de látex, después de 30 min de la aplicación (tiempo necesario para facilitar la absorción de la formulación en la piel) se procedió a la irradiación de los animales. Se irradió a los animales de experimentación con luz Ultravioleta UVA/UVB de la lámpara Repti Glo 5.0 Compact, que emite un espectro continuo entre 270 a 400nm. La salida de UVA/UVB se midió con los sensores Nul 230 y Nul 232 (Neulog). La lámpara se colocó unos 15 cm de distancia de los ratones. Se irradió a los animales de experimentación durante 1 hora con 30 minutos a una dosis de 2.8 J/cm².

3.5.9.2 CAMBIOS INFLAMATORIOS CUTÁNEOS

Eritema

La valoración del grado de enrojecimiento que presentó la zona expuesta de los distintos animales se realizó por el sistema Draize (108) en donde el eritema puede estimarse visualmente y puede tomar valores dentro del rango 0-4.

0 = No eritema

1 = Definido (rojo apreciable)

2 = Moderado (rojo)

3 = Intenso (rojo intenso)

4 = Severo (muy enrojecido-granate)

Edema

Se usó el sistema de anotación Draize (108) que propone una escala de valores para la estimación visual del grado de edema que presentan los animales irradiados. El edema se entiende como el exudado, compuesto por líquido y proteínas, que migra desde la sangre al tejido intersticial, de manera que este exceso de líquido da lugar a una “hinchazón” de la zona fácilmente apreciable (109). La clasificación propuesta por Draize es:

0 = No edema

1 = Observable (desnivel definido)

2 = Moderado (desnivel aproximando de 1 mm)

3 = Severo (desnivel mayor de 1 mm)

Ambos parámetros se evaluaron desde la aparición del primer eritema y edema, después a los 30min, 6h, 24h, 48y 72 horas.

3.5.10 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTORREPARADORA EN RATONES ALBINOS

La evaluación de la capacidad fotorreparadora in vivo se realizó a través de la valoración de cambios morfológicos cutáneos

3.5.10.1 VALORACIÓN DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS CUTÁNEOS

Para el estudio de cambios morfológicos se usaron otros ratones hembra de la cepa Balb/c/CNPB sanos, con un peso aproximado de 30 gramos, de 2 a 3 meses de edad. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 22-25°C, adaptados a ciclos de luz/oscuridad de doce horas diarias. El período de aclimatación antes del proceso experimental fue de 15 días.

Se depilaron a los animales 48 horas antes del tratamiento (42), obteniendo un área aproximada de 8cm² sobre la zona dorsal del animal.

Se irradió a los animales de experimentación con luz Ultravioleta (lámpara Repti Glo 5.0), durante 1 hora con 30 minutos min, a una distancia aproximada de 15 cm de la lámpara con una dosis de 2,8 J/cm² (41) .

Se realizó el tratamiento con las cremas (1%,3% y 5%), durante 5 días, 2 veces al día sobre la zona depilada e irradiada del lomo.

Los animales fueron sacrificados por el método de dislocación cervical y las pieles se colocaron en formol al 10% y fueron llevados a un laboratorio que se encarga de realizar los análisis histopatológicos respectivos.

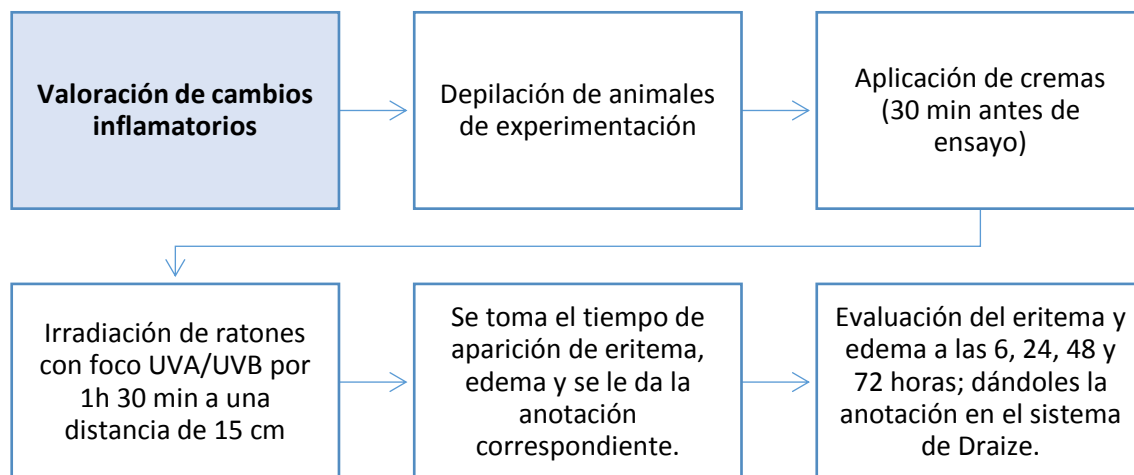
3.5.10.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Las preparaciones teñidas con Hematoxilina – Eosina para el estudio histopatológico fueron visualizadas a través de un microscopio óptico.

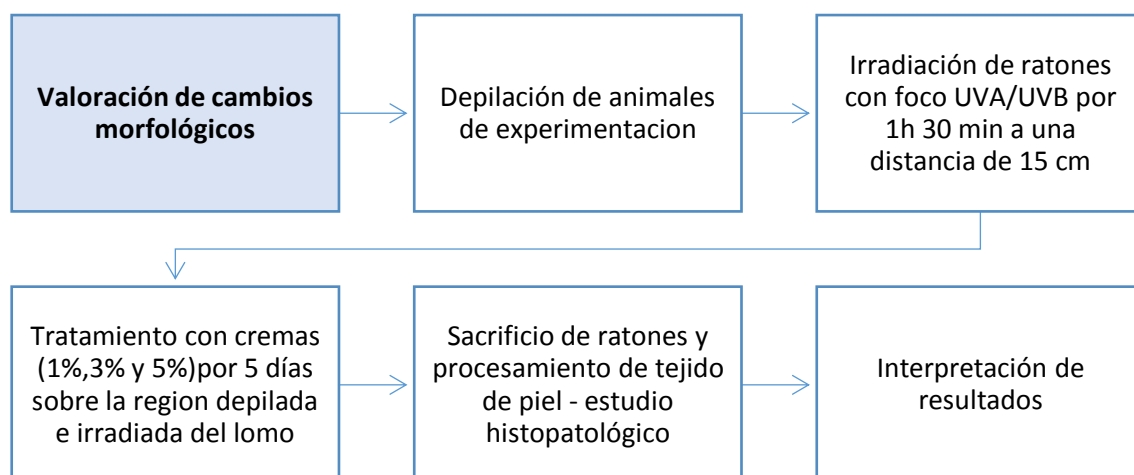
Se evaluó los siguientes parámetros; Hiperqueratosis, espongiosis, úlceras, congestión, anexos y costra.

La valoración se desarrolló por la especialista en el Servicio de histopatología del Hospital Regional del Cusco.

Esquema N° 04: Ensayo de la valoración de cambios inflamatorios – Capacidad fotoprotectora



Esquema N°05: Ensayo de la valoración de cambios morfológicos – Capacidad fotorreparadora



Fuente: Elaboración propia

3.5.11 ENSAYO DE IRRITACIÓN DÉRMICA PRIMARIA DE UNA CREMA CON EXTRACTO DE SEMILLAS DE *Bixa orellana* (ACHIOTE) EN RATONES ALBINOS

Los seis ratones albinos fueron puestos en un período de aclimatación durante 15 días (111). La superficie del lomo de cada animal fue depilado 48 horas antes del tratamiento, se obtuvo un área de exposición de 8 cm² aproximadamente. Se usaron animales que

no presentaron ninguna lesión o irritación dérmica. En el área depilada, la parte inferior fue lugar de aplicación de la sustancia ensayada y la otra superior contigua que fue el control. Los animales fueron divididos en 2 grupos de 3 ratones cada uno. Cada grupo fue tratado con la crema base y con una crema con extracto etanólico al 96% de semillas de achiote seleccionada de acuerdo a los ensayos de determinación de FPS y capacidad fotoprotectora y fotorreparadora realizados previamente.

El método utilizado fue el mismo que se aplicó en el Ensayo de Irritación Dérmica Primaria con extractos de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) en ratones albinos descrita la página número 59.

3.5.12 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Para un manejo adecuado de los resultados de la investigación y una correcta recolección de los datos se utilizaron formatos de recolección de datos previamente elaborados de acuerdo a los ensayos.

Formatos de recolección de datos para:

- Determinación de porcentaje de humedad.
- Determinación del porcentaje de rendimiento.
- Ensayo de irritación dérmica primaria del extracto etanólico de ***Bixa orellana*** (achiote) al 1.0%, 3.0% y 5.0 % en ratones albinos.
- Análisis de características organolépticas de las cremas.
- Valoración de cambios inflamatorios cutáneos.
- Valoración de cambios morfológicos cutáneos.
- Registro de los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda de las cremas.

3.5.13 TÉCNICAS Y ANÁLISIS PARA EL PROCESAMIENTO DE DATOS

En el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS “Statistical Package for Social Sciences”. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA), con el fin de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los datos de las poblaciones muestrales de cada grupo de experimentación.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

Cuadro N°01 : Resultados del porcentaje de Humedad de las semilla *Bixa orellana* (Achiote) en Etanol al 96%

Muestra	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Porcentaje de humedad
Muestra 1	10.79	9.8168	9.0195
Muestra 2	10.95	9.9566	9.0721
Muestra 3	10.05	9.1084	9.9502
		Promedio	9.3479

Fuente: Elaboración propia

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Como se observa en el cuadro N° 01, el porcentaje de humedad de *Bixa orellana* (Achiote), de acuerdo al método gravimétrico es de 9.35%. Este resultado indica que la semilla de esta planta tiene un bajo porcentaje de humedad y está dentro del rango propuesto en otro estudio realizado para obtener el porcentaje de humedad de las semillas de achiote donde los resultados oscilan entre el 8 y 13 % según **J. Devia, L. Saldarriaga** (115).

4.2 RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO CON ETANOL AL 96%

Cuadro N° 02: Resultados del Porcentaje de Rendimiento de la semilla de *Bixa orellana* (Achiote) en Etanol 96%

Muestra	Peso de muestra inicial (g)	Solvente	Peso del extracto final (g)	Rendimiento %
Muestra 1	45.47	Etanol 96%	2.1179	4.6578
Muestra 2	45.06	Etanol 96%	2.0415	4.5306
Muestra 3	45.93	Etanol 96%	1.9882	4.3288
			Promedio	4.5057

Fuente: Elaboración propia

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

De acuerdo a los resultados del cuadro N° 02 se muestra un porcentaje de extracción de 4.51%, siendo este valor cercano al porcentaje de extracción de 5.83% obtenido en el estudio realizado por **L. Rodrigues, S. Alcazar-Alay, A. Petenate et al.**(73) y otro estudio donde se utilizó el etanol como solvente en la técnica de extracción convencional sólido-líquido realizada a temperatura y presión ambiente, se obtuvo un porcentaje de extracción de 3.15% de rendimiento global de semilla de *Bixa orellana* (achiote) , estudio realizado por **L. Rodriguez, S. Alcazar-Alay, M. Gomes et al.** (116)

4.3 RESULTADO DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Bixa orellana* (Achiote).

Cuadro N°03: Resultados del análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico al 96% de la semilla de *Bixa orellana* (Achiote).

Metabolitos	Reactivo	Resultado	Observaciones
Carbohidrato	Molish	+	Anillo violeta
Compuestos Fenólicos	Cloruro férrico al 5% (FeCl ₃)	++	Coloración azulada
Taninos	Solución de gelatina al 5%	+	Precipitado denso blanco
Flavonoides	Shinoda	++	Coloración amarilla a rojo
Leucoantocianidinas	Rosenheim	++	Coloración rojo oscuro
Aminoácidos Libre de Grupos amino	Ninhidrina	-	Coloración violácea
Alcaloides	Dragendorff	+	Precipitado naranja
	Mayer:	+	Precipitado blanco
Quinonas	Reacción Bornträger: Solución de NaOH	++	Coloración roja

Fuente: Elaboración propia

Leyenda			
+++	Abundante	+	Escaso
++	Moderado	-	Ausente

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

La detección de metabolitos secundarios se realizó mediante reactivos de identificación específicos para cada familia de compuesto, obteniéndose en algunas pruebas coloraciones específicas y siendo otras de precipitación.

De acuerdo al cuadro N°03, se determinó moderada presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, leucoantocianidinas y quinonas. Y en escasa cantidad, carbohidratos, taninos y alcaloides

En función a estos resultados el extracto seco hidroalcohólico al 96% de *Bixa orellana* (achiote) presenta efectos beneficiosos en la piel gracias a la presencia de compuestos fenólicos como taninos hidrolizables que fueron identificados por **R.Cruz Lima, A. De Deus Moreno, S. Loureiro De Castro et al.** (117) y flavonoides que también fueron identificados en el estudio realizado por **A. Tamil Selvi, M. Dinesh, R. Satyan et al.** (118)

4.4 RESULTADOS DEL ENSAYO DE IRRITACIÓN DÉRMICA EN RATONES ALBINOS

Cuadro N° 04: Resultado del ensayo de irritación dérmica aguda del extracto al 96% de *Bixa orellana* (Achiote)

Concentración Del extracto	N° animal	Eritema Tiempo (min=minutos, h=hora)					Edema					Suma total	Total Obs (5) =		Valores de irritación Primaria
		30 Min	1h	24 hrs	48 hrs	72 hrs	30 Min	1h	24 hrs	48 hrs	72 hrs				
1%	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5	=	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5	=	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	/5	=	0
	Índice de Irritación Primaria (IIP) = 0.0														
3%	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5	=	0
	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	/5	=	0.2
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5	=	0
	Índice de Irritación Primaria (IIP) = 0.07														
5%	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5	=	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5	=	0
	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	/5	=	0.2
	Índice de Irritación Primaria (IIP) = 0.07														

Fuente: datos experimentales

Descripción de la clase: No irritante (1%,3% y 5%)

Categoría: IV (No irritante, medianamente o ligera irritación a las 72 horas)

Duración del estudio: 72 horas

Cuadro N° 05: Determinación del índice de irritación primaria (PII) a través del test de Draize.

Concentración del extracto	Índice de Irritación Primaria	Criterio de aceptación
1%	0.0	Se aprueba (no irritante)
3%	0.07	Se aprueba (no irritante)
5%	0.07	Se aprueba (no irritante)

Fuente: Elaboración propia

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En el cuadro N° 04 se observa los resultados de la prueba de irritación dérmica aguda realizada en ratones albinos cuando se les aplico el extracto seco etanólico de **Bixa orellana** (achiote), previamente diluido en tween a las concentraciones de 1%, 3% y 5%.

Luego de la aplicación del extracto en los ratones albinos se procedió a realizar las observaciones a los 30 minutos, 1, 24, 48, 72 hrs; finalizadas las observaciones se procedió a calcular el índice de irritación primaria IIP (mediante la escala de valoración de la irritación dérmica primaria – Técnica de Draize) obteniéndose un valor de 0.0 IIP para el extracto al 1%, 0.07 IIP para el extracto al 3% y 0.07 IIP para el extracto al 5%.

Por lo tanto al extracto al 1% con un valor de IIP= 0.0; este valor lo clasifica como sustancia NO IRRITANTE. Para los extractos de 3% y 5% que poseen un IIP=0.07; este valor también los clasifica como sustancias NO IRRITANTES.

Finalmente según la categoría tóxica de la irritación dérmica (tabla N°06), el extracto etanólico de la semilla de **Bixa orellana** (Achiote) al 1%, 3% y 5% pertenecen a la Categoría toxica de irritación dérmica IV que los clasifica como sustancias NO IRRITANTES de acuerdo a la escala de valoración de la irritación dérmica aguda – Técnica Draize.

Estos resultados muestran relación con otro estudio reportado por **M. Germano, R. De Pasquale, A. Rapisarda et al.** Donde se ha demostrado la ausencia de sensibilización e irritación en piel de conejos tratados con extracto de **Bixa orellana** (Achiote) con el método draize (78).

Por lo tanto se seleccionó estas tres concentraciones (1%, 3% y 5%) del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote) para el estudio de la capacidad fotorreparadora y fotoprotectora tanto in vivo como in vitro, siendo estas concentraciones las adecuadas para la incorporación en una crema base, sabiendo que no producen irritación considerable en la piel de los ratones y así no afectarán los resultados obtenidos posteriormente.

4.5 RESULTADOS DE LA INCORPORACIÓN DEL EXTRACTO SECO EN LA FORMA FARMACÉUTICA DE CREMA, A LAS CONCENTRACIONES DE 1%, 3% Y 5%

Cuadro N°06: Resultado del análisis organoléptico y fisicoquímico

Análisis organoléptico				
Día 1				
Análisis	Formulación			
	Crema base	Crema al 1%	Crema al 3%	Crema al 5%
Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Textura	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Consistencia	Ligera	Ligera	Ligera	Ligera
Color	blanco	Amarillo	Naranja	Naranja oscuro
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
Día 14				
Análisis	Formulación			
	Crema base	Crema al 1%	Crema al 3%	Crema al 5%
Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Textura	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Consistencia	Ligera	Ligera	Ligera	Ligera
Color	blanco	Amarillo	Naranja	Naranja oscuro
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
Análisis fisicoquímico				
pH	6.33	6.36	6.38	6.40
Extensibilidad	20.42 mm ²	21.20 mm ²	21.99 mm ²	22.38 mm ²

Fuente: Elaboración propia

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En el cuadro N°06 se muestra los resultados del análisis organoléptico de las cremas elaboradas a base del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote). Los indicadores evaluados fueron aspecto, textura, consistencia, color, olor.

Según el cuadro se aprecia que las formulaciones presentan un aspecto homogéneo, textura cremosa y consistencia ligera en cuanto al color; la crema base es de color blanco, la crema al 1% es de color amarilla, la crema al 3% presenta un color naranja y la crema al 5% presenta un color naranja oscuro. El olor para las cuatro muestras es característico. Estas características se mantuvieron durante las dos semanas de evaluación

En cuanto a los estudios fisicoquímicos se obtuvo que la crema base presento un pH de 6.33 y una extensibilidad de 20.42 mm²; la crema al 1% presento un pH de 6.36 y una extensibilidad de 21.20 mm²; la crema al 3% presento un pH de 6.38 y una extensibilidad de 21.99 mm² y la crema al 5% presento un pH de 6.40 y una extensibilidad de 22.38 mm².

De acuerdo a estos resultados podemos concluir que la formulación es adecuada para los ensayos posteriores por tener adecuada homogenización entre la crema base y el extracto.

4.6 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN IN VITRO DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS) DEL PRODUCTO COMERCIAL PATRÓN

Cuadro N° 07: Resultado de las Absorbancias del Producto Comercial

Longitud de onda (λ)	EExI	Absorbancia	EExIxAbs
290	0.0150	5.7278	0.0859
295	0.0817	4.9276	0.4025
300	0.2874	4.2080	1.2093
305	0.3278	4.1454	1.3588
310	0.1864	4.0440	0.7538
315	0.0839	3.8398	0.3221
320	0.018	3.2924	0.0592
		Sumatoria	4.1919
		x10	41.9196
		FPS	42

Fuente: Elaboración propia

FÓRMULA PARA LA DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Donde:

- FC : Factor de correlación (igual a 10) determinado en función a dos lociones fotoprotectoras de FPS conocidos, de semejante manera a una loción que contiene 8% de Homosalato de FPS igual a 4.
- EE (λ) : Efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ .
- I(λ) : Intensidad del sol en la longitud de onda λ .
- Abs (λ) : Absorbancia de la solución en la longitud de onda

Cuadro N° 08: Factor de Protección Solar del Producto Patrón

Producto Patrón	Composición declarada	FPS declarado	FPS calculado
Bahia Solar- Super Block	Metoxicinamato de etilo	55	42

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En los cuadros N°07 y 08 se observa que el FPS obtenido del producto comercial es de 42 de acuerdo a la metodología usada por Mansur (112). La diferencia entre FPS declarado y el calculado podría deberse a que los bloqueadores solares presentan diferentes características que afectan el resultado final de los SPF, la combinación y concentración de filtros físicos y químicos, tipo de emulsión, adición de excipientes, el pH del sistema y propiedades reológicas, entre otros factores, que pueden aumentar o disminuir la absorción UV de cada filtro, según lo revisado en el estudio realizado por **L. Segura, A. Mamani** quienes obtuvieron un valor de FPS de 56.1 para el mismo producto (50). Otro factor importante es el proceso de filtración utilizado en el ensayo (50).

4.7 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN IN VITRO DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS) DE LAS CREMAS CON EL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Bixa orellana* (ACHIOTE)

Cuadro N° 09: Resultados de las Absorbancias en las formulaciones al 1.0 ,3.0 y 5.0 % de las cremas con el extracto etanólico de *Bixa orellana* (Achiote)

Longitud de onda λ (nm)	Absorbancias		
	1%	3%	5%
290	0.1166	0.1203	0.1307
295	0.1155	0.1224	0.1321
300	0.1135	0.1217	0.1344
305	0.1121	0.1217	0.1354
310	0.1106	0.1212	0.1366
315	0.1094	0.1214	0.1383
320	0.1093	0.122	0.1368

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 10: Obtención del factor de protección solar de las cremas con el extracto etanólico de *Bixa orellana* (Achiote)

Absorbancias					EExlxAbs		
(nm)	EExl	1%	3%	5%	1%	3%	5%
290	0.015	0.1166	0.1203	0.1307	0.001749	0.0018045	0.0019605
295	0.0817	0.1155	0.1224	0.1321	0.00943635	0.01000008	0.01079257
300	0.2874	0.1135	0.1217	0.1344	0.0326199	0.03497658	0.03862656
305	0.3278	0.1121	0.1217	0.1354	0.03674638	0.03989326	0.04438412
310	0.1864	0.1106	0.1212	0.1366	0.02061584	0.02259168	0.02546224
315	0.0839	0.1094	0.1214	0.1383	0.00917866	0.01018546	0.01160337
320	0.018	0.1093	0.122	0.1368	0.0019674	0.002196	0.0024624
		Sumatoria			0.11231353	0.12164756	0.13529176
		X 10			1.1231353	1.2164756	1.3529176
FPS					1.1	1.2	1.4

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 11: Resultado del cálculo del FPS de las cremas con el extracto etanólico de *Bixa orellana* (Achiote)

Extracto etanólico de semilla	FPS calculado
1%	1.1
3%	1.2
5%	1.4

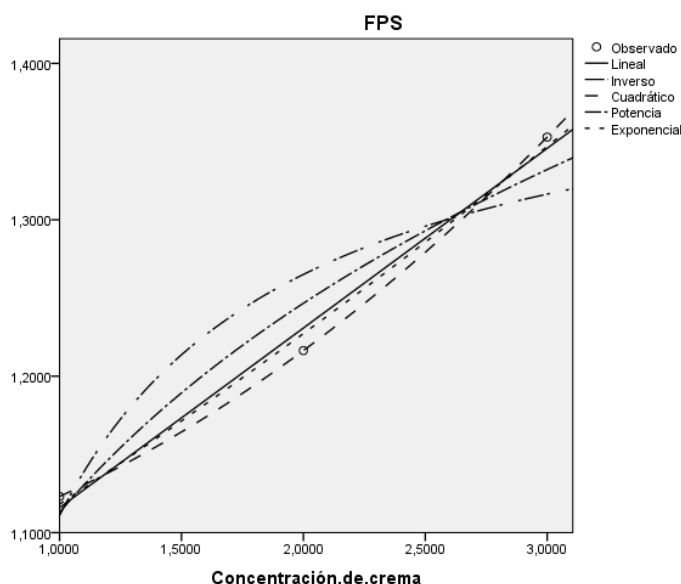
Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 12: Análisis de regresión lineal general para el cálculo del FPS de las cremas elaboradas con el extracto etanólico de *Bixa orellana* . Resumen de modelo y estimaciones de parámetro.

Resumen de modelo y estimaciones de parámetro								
Variable dependiente: FPS								
Ecuación	Resumen del modelo					Estimaciones de parámetro		
	R ²	F	gl1	gl2	Sig.	Constante	b1	b2
Lineal	0.988	84.889	1	1	0.069	1.001	0.115	
Inverso	0.856	5.947	1	1	0.248	1.419	-0.308	
Cuadrático	1.000	.	2	0	.	1.073	0.029	0.022
Potencia	0.947	17.882	1	1	0.148	1.113	0.164	
Exponencial	0.993	147.467	1	1	0.052	1.019	0.093	

Fuente: Elaboración propia

Gráfico N° 01: Grafico Factor de Protección Vs Concentración de la crema



ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Las absorbancias obtenidas por las cremas a las que se les incorporó el extracto etanólico de semillas de achiote se muestran en el cuadro N°09. Por otro lado en el cuadro N°10 se calculan de acuerdo a la formula los valores de Factor de Protección Solar para cada crema, donde se obtuvieron valores de FPS = 1.1 para la crema al 1%, FPS =1.2 para la crema al 3% y FPS = 1.4 para la crema al 5% respectivamente. La obtención de estos valores bajos puede ser debido a que en el proceso de determinación del FPS específicamente en el proceso de filtrado se realizo con papel filtro convencional y no con el recomendado por el estudio realizado por **L. Segura, A. Mamani** (50). Sin embargo otro motivo podría ser debido a que se utilizo el extracto total de la semilla sin la purificación del metabolito como es la bixina al que le atribuyen capacidad

fotoprotectora diversos autores como **M. de la Vega, D. Zhang, G. Wondrak.**(40) y **S. Tao, S. Park, M. Rojo de la Vega et al.**(119)

El hecho de utilizar el extracto completo produjo resultados similares con otros estudios donde utilizaron el mismo método de medición del FPS como el realizado por **R. Osorio, T. Moya** quienes evaluaron el FPS del extracto hidroalcohólico de ***Fragaria vesca L.***, incorporado en una formulación tópica al 5% dando un valor de 0.83 de FPS. Otro ejemplo en el estudio realizado por **F. de Souza, G. Campos, J. Packer** quienes determinaron la actividad fotoprotectora del extracto de ***Malpighia glabra L.*** en una emulsion a 10%, obteniendo un valor de 0.14 de FPS.

En el cuadro N°12 el modelo cuadrático que presenta un valor de $R^2 = 1$ indica que el valor del FPS es directamente proporcional al aumento de la concentración del extracto.

Al observar el grafico N°01 los resultados muestran que a medida que aumenta la concentración de la crema con el extracto etanólico al 96% de las semilla de ***Bixa orellana*** (achiote) también aumenta el FPS aunque no es significativo.

4.8 RESULTADOS DE LA VALORACIÓN DE CAMBIOS INFLAMATORIOS CUTÁNEOS

Cuadro N° 13: Resultados de la valoración de cambios inflamatorios cutáneos

Grupo	Ratón	Eritema				Edema			
		6h	24h	48h	72h	6h	24h	48h	72h
1%	R ₁	1	1	1	0	1	0	0	0
	R ₂	1	0	0	0	0	0	0	0
	R ₃	1	1	0	0	0	0	0	0
3%	R ₁	1	1	0	0	1	0	0	0
	R ₂	1	0	0	0	0	0	0	0
	R ₃	1	0	0	0	0	0	0	0
5%	R ₁	1	0	0	0	0	0	0	0
	R ₂	1	0	0	0	0	0	0	0
	R ₃	1	0	0	0	0	0	0	0
Control positivo	R ₁	2	2	2	1	2	1	1	1
	R ₂	2	1	1	1	1	1	1	0
	R ₃	2	2	1	1	1	1	1	0
Control negativo	R ₁	0	0	0	0	0	0	0	0
	R ₂	0	0	0	0	0	0	0	0
	R ₃	0	0	0	0	0	0	0	0
Patrón	R ₁	1	0	0	0	0	0	0	0
	R ₂	1	0	0	0	0	0	0	0
	R ₃	1	1	0	0	0	0	0	0

Fuente: Datos experimentales

Leyenda:

- Control negativo: Grupo de ratones que no fueron tratados con ninguna crema y no fueron irradiados.
- Control positivo: Grupo de ratones que no fueron tratados con ninguna crema y fueron expuestos a irradiación.
- Patrón: Grupo de ratones que fueron tratados con el producto patrón.
- 1%: Grupo de ratones que fueron tratados con crema con extracto de **Bixa orellana** (Achiote) al 1%.
- 3%: Grupo de ratones que fueron tratados con crema con extracto de **Bixa orellana** (Achiote) al 3%.
- 5%: Grupo de ratones que fueron tratados con crema con extracto de **Bixa orellana** (Achiote) al 5%.

Donde los valores de eritema y edema son:

Eritema 0 = Ausencia de eritema.
 1 = Eritema muy ligero (casi imperceptible - rojo apreciable).
 2 = Eritema bien definido (rojo).
 3 = De moderado a severo (rojo intenso).
 4 = Eritema muy severo (muy enrojecido - granate).

- Edema 0 = Ausencia de edema.
 1 = Edema muy ligero (casi imperceptible).
 2 = Edema ligero (desnivel definido).
 3 = Edema moderado (levantamiento aproximado de 1mm).
 4= Edema severo (desnivel mayor de 1 mm).

Cuadro N° 14 : Análisis Estadístico de la Valoración de Edema y Eritema respecto a la Concentración del Extracto Etanólico de *Bixa orellana* (Achiote) en la Crema Base, crema patrón y controles y Diferencias de Medias según Concentración.

Cambios		N°	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Eritema	1%	12	0.50	0.522	0.151	0.17	0.83	0	1
	3%	12	0.33	0.492	0.142	0.02	0.65	0	1
	5%	12	0.25	0.452	0.131	-0.04	0.54	0	1
	patrón	12	0.33	0.492	0.142	0.2	0.65	0	1
	c. positivo	12	1.50	0.522	0.151	1.17	1.83	1	2
	c. negativo	12	0.00	0.000	0.000	0.00	0.00	0	0
	Total	72	0.49	0.650	0.077	0.33	0.64	0	2
Edema	1%	12	0.08	0.289	0.083	-0.10	0.27	0	1
	3%	12	0.08	0.289	0.083	-0.10	0.27	0	1
	5%	12	0.00	0.000	0.000	0.00	0.00	0	0
	patrón	12	0.00	0.000	0.000	0.00	0.00	0	0
	c. positivo	12	0.92	0.515	0.149	0.59	1.24	0	2
	c. negativo	12	0.00	0.000	0.00	0.00	0.00	0	0
	Total	72	0.18	0.422	0.050	0.08	0.28	0	2

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

El cuadro N°14, contiene un análisis descriptivo de las variables dependientes (eritema y edema) por grupos de tratamiento tanto de las cremas con el extracto etanólico de las semillas de achiote, la crema patrón y los controles, así como, los límites superior e inferior para las medias de cada grupo al 95% de confianza. En este cuadro también se observan las medias para cada grupo de tratamiento.

Cuadro N°15: Prueba de análisis de varianza (ANOVA).

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Eritema	Entre grupos	16.403	5	3.281	15.940	0.000
	Dentro de grupos	13.583	66	0.206		
	Total	29.986	71			
Edema	Entre grupos	7.903	5	1.581	21.961	0.000
	Dentro de grupos	4.750	66	0.072		
	Total	12.653	71			

Fuente: Datos estadísticos

Interpretación:

El cuadro N° 15, muestra los resultados del ANOVA. Para **Eritema**, se observa un valor del estadístico de prueba $F = 15.940$ y la significación de 0.00. Al ser la significación menor de 0.05 es que las diferencias de medias de los grupos, son estadísticamente significativas. Esto nos indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos.

También en este cuadro se muestra los resultados del ANOVA para **Edema**, se observa un valor del estadístico de prueba $F = 21.961$ y la significación de 0.00. Al ser la significación menor de 0.05 es que las diferencias de medias de los grupos, son estadísticamente significativas. Esto nos indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos.

Cuadro N°16: Eritema –HSD de Tukey

Concentración de extracto	N°	Subconjunto para $\alpha=0.05$	
		1	2
c. negativo	12	0.00	
5%	12	0.25	
3%	12	0.33	
1%	12	0.50	
Patrón	12	0.33	
c. positivo	12		1.50
Sig.		0.089	1.000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.			

Fuente: datos experimentales

Interpretación:

La prueba de Tukey sirve para evaluar las hipótesis:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$ (las medias son iguales)

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$ (las medias son diferentes)

Eritema según las diferentes cremas aplicadas y controles (sub conjunto 1): Sig. = 0.089 > 0.05 entonces se acepta H_0

Eritema según las diferentes cremas aplicadas y controles (sub conjunto 2): Sig. = 1.000 > 0.05 entonces se acepta H_0

En el cuadro N° 16, se aprecian los resultados posteriores al ANOVA, la prueba de comparación de Tukey utilizando un nivel de confianza de $\alpha = 0.05$, se observa que no existen grupos diferenciados.

Cuadro N° 17: Edema – HSD de Tukey

Concentración de extracto	N°	Subconjunto para alfa=0.05	
		1	2
5%	12	0.00	
3%	12	0.08	
1%	12	0.08	
patrón	12	0.00	
c. positivo	12		0.92
c. negativo	12	0.00	
Sig.		0.973	1.000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.			

Fuente: Datos experimentales

Interpretación:

Edema según las diferentes cremas aplicadas y controles (sub conjunto 1) : Sig. = 0.973 > 0.05 entonces se acepta H_0

Edema según las diferentes cremas aplicadas y controles (sub conjunto 2) : Sig. = 1.000 > 0.05 entonces se acepta H_0

En el Cuadro N° 17, se aprecian los resultados posteriores al ANOVA, la prueba de comparación de Tukey utilizando un nivel de confianza de $\alpha = 0.05$, se observa que no existen grupos diferenciados.

Gráfico N°02 : Gráfico de Medias de la Valoración de Eritema respecto a la Concentración del Extracto etanólico de la *Bixa orellana* (Achiote) en la crema, crema patrón y controles

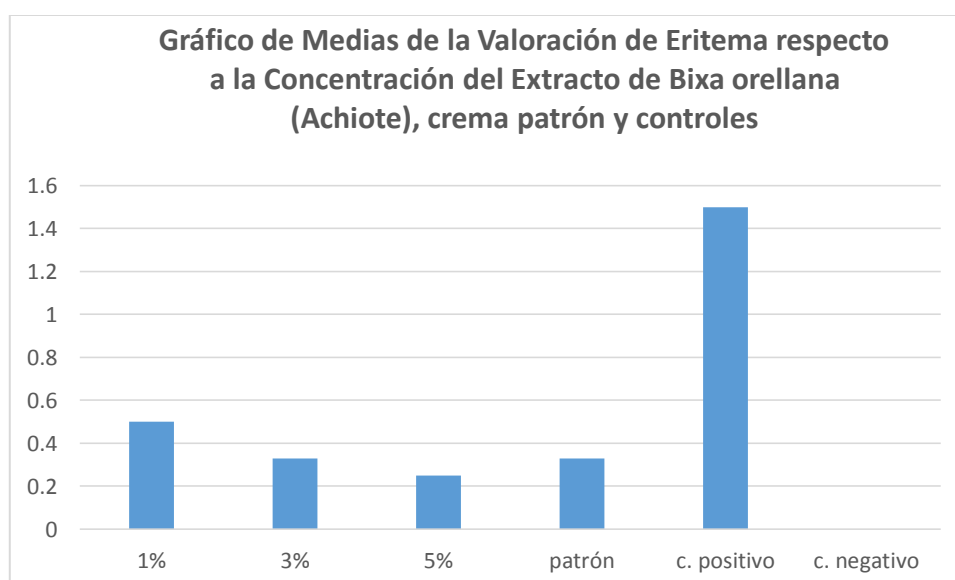
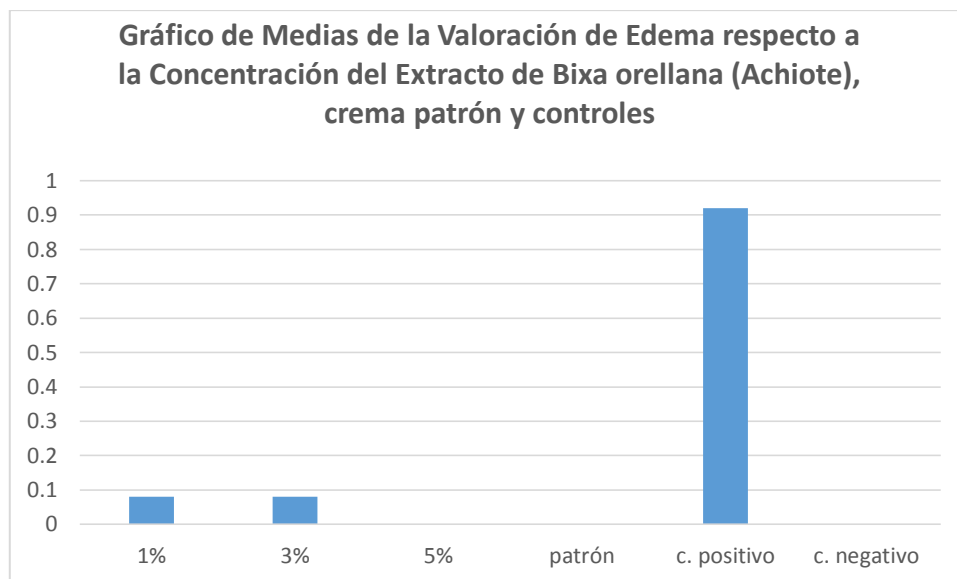


Gráfico N°03: Gráfico de Medias de la Valoración de Edema respecto a la Concentración del Extracto etanólico de la *Bixa orellana* (Achiote) en la crema, crema patrón y controles.



Interpretación:

De los gráficos N° 02 y 03 según la concentración se observa que las medias del eritema y el edema son mayores cuando la concentración de la crema es mínima es decir del 1% y estos van descendiendo cuando la concentración de la crema aumenta. Se observa una clara diferenciación con el control positivo.

Cuadro N°18: Análisis Estadístico de la Valoración de edema y eritema respecto al Tiempo del Extracto de *Bixa orellana* (Achiote) en la Crema Base – Contraste de Levene y Diferencias de Medias según el Tiempo

Cambios						95% de intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
		N°	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior		
Eritema	6 Hrs	18	1.00	0.594	0.140	0.70	1.30	0	2
	24 Hrs	18	0.50	0.707	0.167	0.15	0.85	0	2
	48 Hrs	18	0.28	0.575	0.135	-0.01	0.56	0	2
	72 Hrs	18	0.17	0.383	0.090	-0.02	0.36	0	1
	Total	72	0.49	0.650	0.077	0.33	0.64	0	2
Edema	6 Hrs	18	0.33	0.594	0.140	0.04	0.63	0	2
	24 Hrs	18	0.17	0.383	0.090	-0.02	0.36	0	1
	48 Hrs	18	0.17	0.383	0.090	-0,02	0.36	0	1
	72 Hrs	18	0.06	0.236	0.056	-0.06	0,17	0	1
	Total	72	0.18	0.422	0.050	0.08	0.28	0	2

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

El Cuadro N° 18, presenta un análisis descriptivo de las variables dependientes por el tiempo, así como, los límites superior e inferior para las medias de cada grupo al 95% de confianza. También se observan las medias para cada tiempo de evaluación.

Cuadro N° 19: Prueba de análisis de varianza (ANOVA).

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Eritema	Entre grupos	7.375	3	2.458	7.393	0.000
	Dentro de grupos	22.611	68	0.333		
	Total	29.986	71			
Edema	Entre grupos	0.708	3	0.236	1.344	0.267
	Dentro de grupos	11.944	68	0.176		
	Total	12.653	71			

Fuente: Datos estadísticos

Interpretación:

El cuadro N° 19, muestra los resultados del ANOVA para **Eritema**, se observa un valor del estadístico de prueba $F = 7.393$ y la significación de 0.000. Al ser la significación menor de 0.05 es que las diferencias de medias de los grupos, son estadísticamente significativas. Esto nos indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos. También en este cuadro se muestra los resultados del ANOVA para **Edema**, se observa un valor del estadístico de prueba $F = 1.344$ y la significación de 0.267. Al ser la significación mayor de 0.05 es que las diferencias de medias de los grupos, no son estadísticamente significativas. Esto nos indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de grupos.

Cuadro N°20: Eritema – HSD de Tukey

Concentración de extracto	N°	Subconjunto para $\alpha=0.05$	
		1	2
6	18		1.00
24	18	0.50	0.50
48	18	0.28	
72	18	0.17	
Sig.		0.314	0.054
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 18.000			

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

La prueba de Tukey sirve para evaluar las hipótesis:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$ (las medias son iguales)

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$ (las medias son diferentes)

Eritema según el tiempo (sub conjunto 1): Sig. = 0.314 > 0.05 entonces se acepta H_0

Eritema según el tiempo (sub conjunto 2): Sig. = 0.054 > 0.05 entonces se acepta H_0

En el cuadro N° 20, se aprecian los resultados posteriores al ANOVA, la prueba de comparación de Tukey utilizando un nivel de confianza de $\alpha = 0.05$.

Cuadro N° 21: Edema – HSD de Tukey

Concentración de extracto	N°	Subconjunto para $\alpha=0.05$ 1
6	18	0.33
24	18	0.17
48	18	0.17
72	18	0.06
Sig.		0.202
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.		
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 18.000		

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

Edema según el tiempo: Sig. = 0.202 > 0.05 entonces se acepta H_0

En el Cuadro N° 21, se aprecian los resultados posteriores al ANOVA, la prueba de comparación de Tukey utilizando un nivel de confianza de $\alpha = 0.05$, se observa que no existen grupos diferenciados.

Gráfico N° 04: Gráfico de Medias de la Valoración de Eritema respecto al Tiempo Después de la Exposición a Radiación Ultravioleta

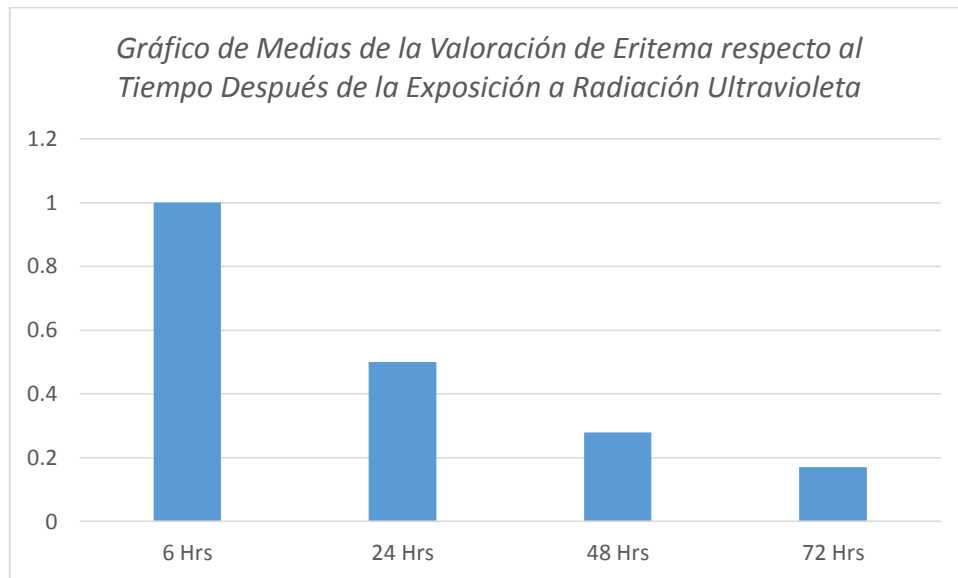
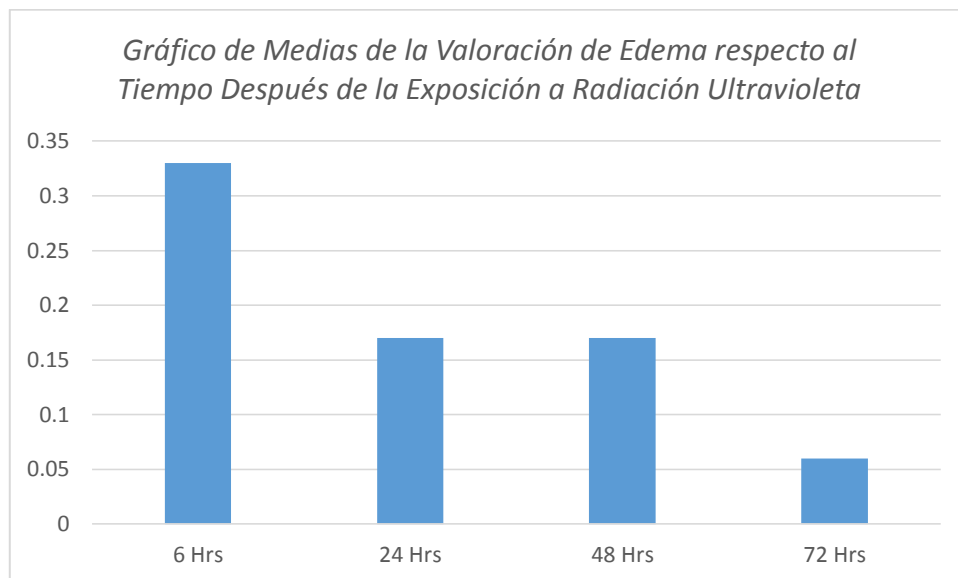


Gráfico N° 05: Gráfico de Medias de la Valoración de Edema respecto al Tiempo Después de la Exposición a Radiación Ultravioleta



Interpretación:

De los graficos N°04 y 05 según el tiempo el eritema y el edema son máximos a las 6 y 24 horas y disminuyen entre las 48 y 72 horas.

4.9 RESULTADOS DE LA VALORACIÓN DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS CUTÁNEOS

Cuadro N°22: Resultados de la valoración de cambios morfológicos cutáneos – Resultados histopatológicos

Grupo	N° muestras histológicas	Hiperqueratosis	Espongiosis	Úlceras	Congestión	Anexos	Costra	Hiperplasia
Control Negativo	3	LEVE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	INCONSTANTE	AUSENTE	AUSENTE
Control Positivo	3	MODERADA	LEVE	GRADO 2	AUSENTE	DISMINUIDO	PRESENTE	PRESENTE
Patrón	3	LEVE	ESCASA	AUSENTE	ESCASA	INCONSTANTE	PRESENTE	PRESENTE
1%	3	LEVE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	CONSERVADOS	AUSENTE	PRESENTE
3%	3	MODERADA	ESCASA	AUSENTE	ESCASA	CONSERVADOS	PRESENTE	PRESENTE
5%	3	ESCASA	MODERADA	AUSENTE	AUSENTE	CONSERVADOS	PRESENTE	PRESENTE

Fuente: Datos experimentales

Control negativo: Grupo de ratones que no fueron tratados con ninguna crema y no fueron irradiados.

Control positivo: Grupo de ratones que no fueron tratados con ninguna crema y fueron expuestos a irradiación.

Patrón: Grupo de ratones que fueron tratados con el producto patrón.

1%: Grupo de ratones que fueron tratados con crema con extracto de ***Bixa orellana*** (Achiote) al 1%.

3%: Grupo de ratones que fueron tratados con crema con extracto de ***Bixa orellana*** (Achiote) al 3%.

5%: Grupo de ratones que fueron tratados con crema con extracto de ***Bixa orellana*** (Achiote) al 5%

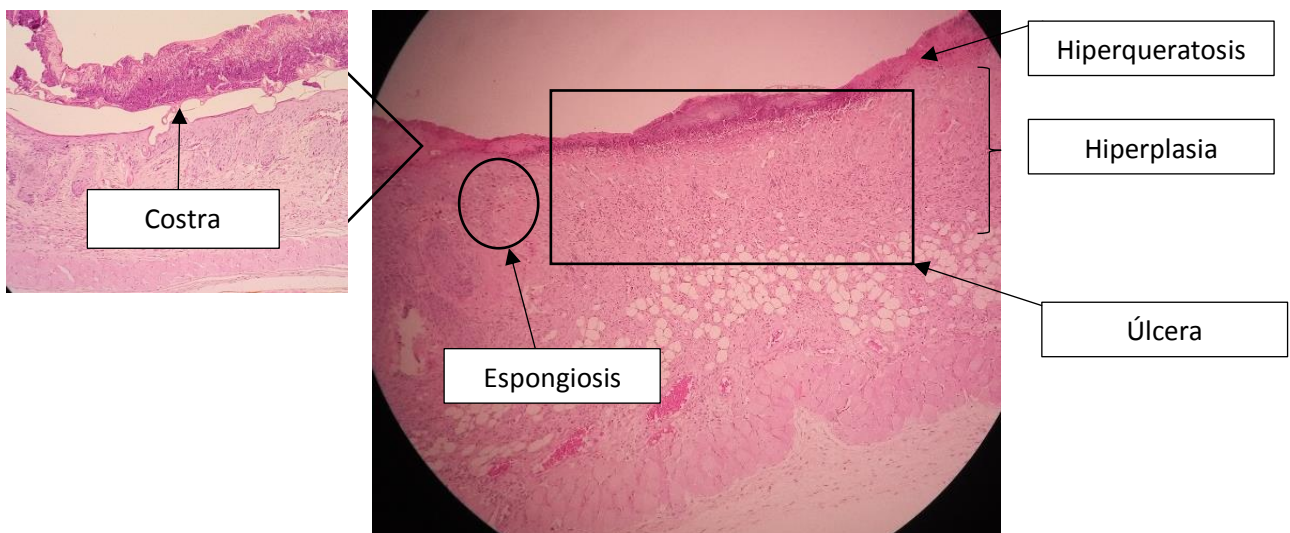
Fotografías de las muestras de tejido histopatológico

Fotografía N°01: Estudio histopatológico: piel normal de ratón albino



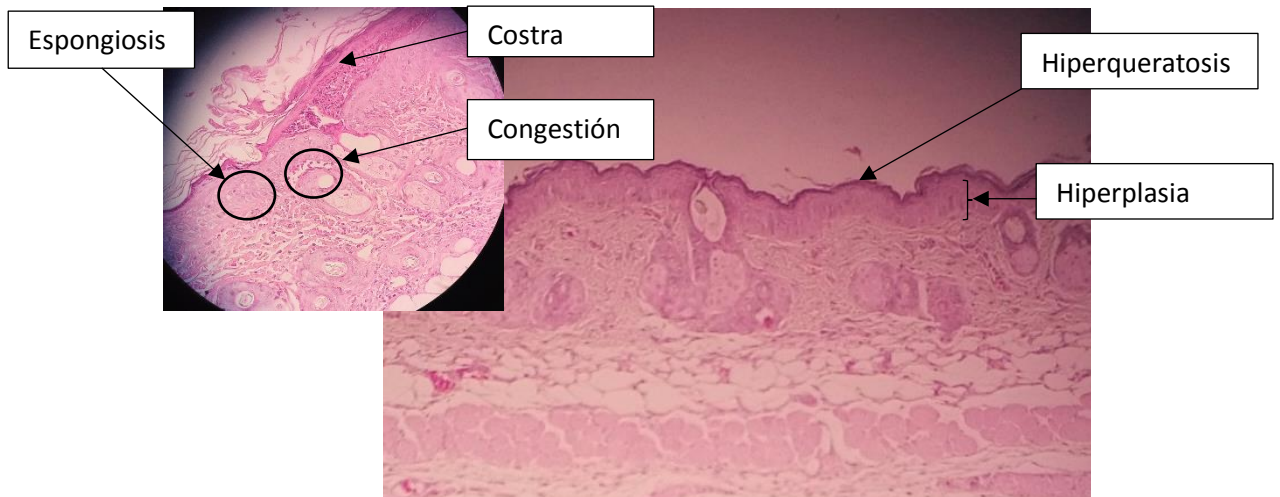
En esta imagen se muestra la piel normal del ratón, como se observa existe una hiperqueratosis leve.

Fotografía N°02: Control positivo



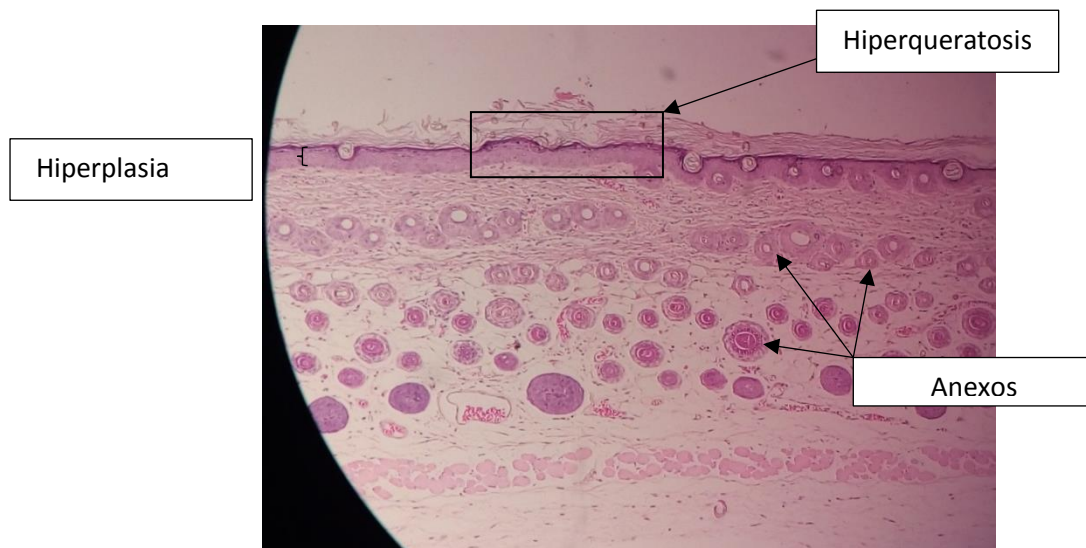
En la imagen se muestra que el control positivo perteneciente al ratón que fue irradiado y no fue tratado con ninguna crema. Presenta hiperqueratosis moderada, espongiosis leve, úlcera de grado 2, costra e hiperplasia presente.

Fotografía N°03: Piel de ratón tratada con crema Patrón



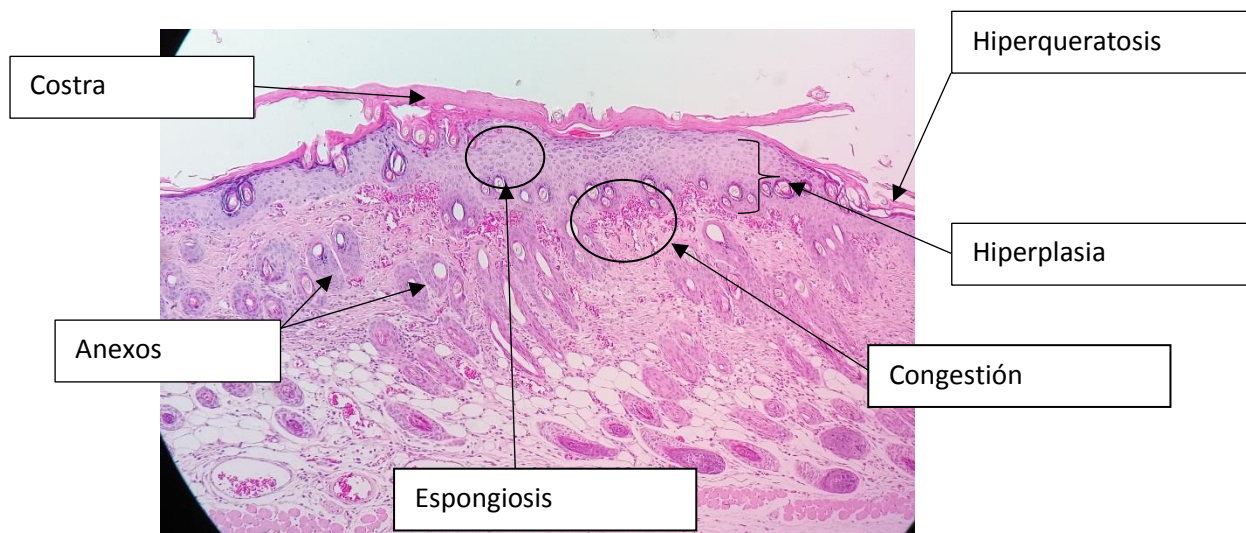
La piel tratada con el producto patrón presenta hiperqueratosis leve, espongiosis escasa, congestión escasa, presenta costra e hiperplasia.

Fotografía N°04: Crema al 1%



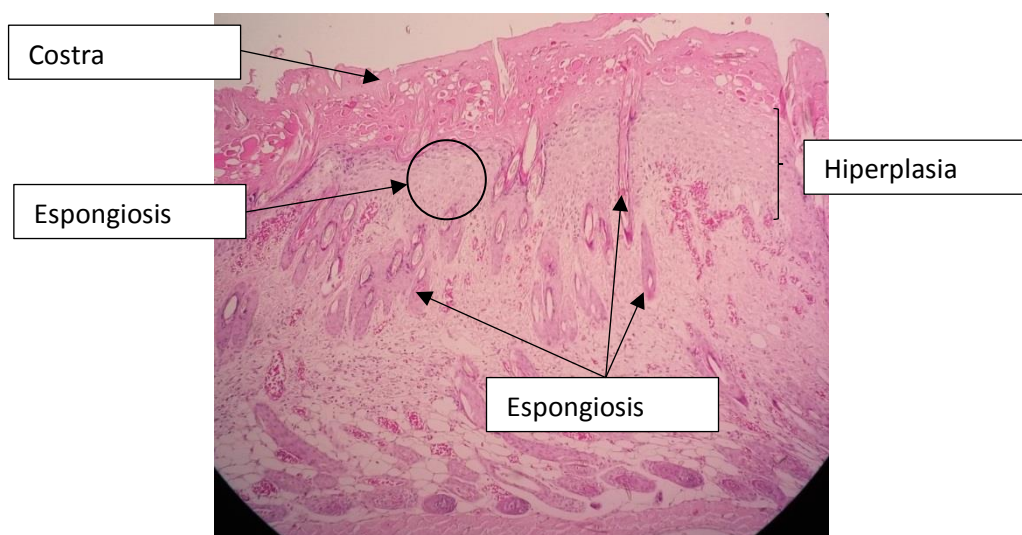
La piel tratada con la crema al 1% presenta hiperqueratosis leve e hiperplasia leve y una notable proliferación de anexos.

Fotografía N°05: Crema al 3%



En La piel tratada con un 3% de crema se observa una hiperqueratosis moderada, espongiosis escasa, congestion escasa, costra, hiperplasia y varios anexos.

Fotografía N°06: Crema al 5%



En esta imagen se observa la piel que fue tratada con la crema al 5% y se observa espongiosis moderada, costra presente, hiperplasia y anexos

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Como se aprecia en el cuadro N° 22, las alteraciones morfológicas observadas en la piel de animales de experimentación previamente depilados e irradiados, son en menor grado en los grupos tratados con la crema con el extracto etanólico de semillas de **Bixa orellana** (Achiote) al 1% mientras que los resultados con la crema patrón (Bahia Superblock) y las cremas a las concentraciones de 3% y 5% de dicho extracto presentan

varias alteraciones en la morfología de la piel, siendo estas hiperqueratosis, congestión, hiperplasia; la presencia de costra fue común tanto en las cremas con el extracto etanólico y el producto patrón.

Elección de crema con extracto etanílico de semillas de achiote para ensayo de Irritación Dérmica Primaria

Se eligió la **crema al 1.0 %** por presentar un FPS similar a las otras concentraciones de 3.0 y 5.0 %. Ya que en las pruebas de capacidad fotoprotectora realizada con animales de experimentación presento un efecto similar a las otras concentraciones evaluadas, sin embargo en la prueba de la capacidad fotorreparadora específicamente en el ensayo de Valoración de Cambios Morfológicos cutáneos la crema al 1.0% presenta un mejor resultado en comparación a las otras concentraciones. Por ello se realizó a esta muestra el ensayo de Irritación Dérmica junto a la crema base utilizada en este estudio.

4.10 RESULTADOS DEL ENSAYO DE IRRITACIÓN DÉRMICA PRIMARIA EN RATONES ALBINOS DE LA CREMA AL 1% CON EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS DE ACHIOTE Y LA CREMA BASE.

Cuadro N° 23: Resultado del ensayo de irritación dérmica aguda de la crema al 1% de *Bixa orellana* (Achiote)

Concentración de la crema	N° animal	Eritema Tiempo (min=minutos, h=hora)					Edema					Suma total	Total Obs (5) =	Valores de irritación Primaria
		30 Min	1 h	24	48	72	30	1	24	48	72			
Crema al 1%	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5 =	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5 =	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5 =	0
	Índice de Irritación Primaria (IIP) = 0.0													
Crema base	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5 =	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5 =	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/5 =	0
	Índice de Irritación Primaria (IIP) = 0.0													

Fuente: datos experimentales

Descripción de la clase: No irritante (Crema al 1% y Crema base)

Categoría: IV (No irritante, medianamente o ligera irritación a las 72 horas)

Duración del estudio: 72 horas

Cuadro N° 24 Determinación del índice de irritación primaria (PII) a través del test de Draize

Concentración de la crema	Índice de Irritación Primaria	Criterio de aceptación
1%	0.0	Se aprueba (no irritante)
Crema base	0.0	Se aprueba (no irritante)

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En el cuadro N° 23 se observa los resultados de la prueba de irritación dérmica primaria realizada en ratones albinos cuando se les aplico la crema al 1% del etanólico de **Bixa orellana (achiote)** y la crema base.

Luego de la aplicación del extracto en los ratones albinos se procedió a realizar las observaciones a los 30 minutos, 1, 24, 48, 72 hrs; finalizadas observaciones se procedió a calcular el índice de irritación primaria IIP (mediante la escala de valoración de la irritación dérmica primaria – Técnica de Draize) siendo 0.0 para la crema al 1% y 0.0 para la crema base.

Para la crema al 1% con un valor de IIP=0.0; este valor lo clasifica como sustancia NO IRRITANTE. Para crema base evaluada cuyo valor también es de un IIP=0.0; también se clasifica como sustancia NO IRRITANTE.

CONCLUSIONES

De la investigación realizada en las semillas de **Bixa orellana** (Achiote), se concluye que:

1. La selección y recolección semillas de **Bixa orellana** (achiote), permitió la obtención del extracto etanólico seco, el que presentó un porcentaje de rendimiento de 4. 51%.
2. En el análisis fitoquímico cualitativo realizado al extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote), se observó la presencia moderada de compuestos fenólicos, flavonoides, leucoantocianidinas y quinonas.
3. El estudio de Irritación Dérmica a diferentes concentraciones del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote) disuelto en tween 80 en ratones albinos dio como resultado que, para el 1% de extracto se obtuvo un IIP de 0.0 (Categoría no irritante), al 3% de extracto se obtuvo un IIP de 0.07 (Categoría no irritante) y al 5% de extracto se obtuvo un IIP de 0.07 (Categoría no irritante)
4. La crema base elaborada que permitió la incorporación del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote) a las concentraciones de 1.0%, 3.0% y 5.0%; presentó aspecto homogéneo, textura cremosa, consistencia ligera, olor característico y colores que van del amarillo al naranja oscuro en el análisis organoléptico en todas las concentraciones. En cuanto a los estudios fisicoquímicos se obtuvo que la crema al 1% presento un pH de 6.36 y una extensibilidad de 21.20 mm² ; la crema al 3% presento un pH de 6.38 y una extensibilidad de 21.99 mm² y la crema al 5% presento un pH de 6.40 y una extensibilidad de 22.38 mm².
5. La capacidad fotoprotectora de la crema a diferentes concentraciones del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote) fue obtenida a través del cálculo in vitro del FPS. Para la crema al 1.0 % se calculó un valor de FPS de 1.1, para la crema al 3.0% un FPS de 1.2 y para la crema al 5.0 % un FPS de 1.4.
6. En el ensayo de la capacidad fotoprotectora in vivo de la crema a diferentes concentraciones del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote) mediante la valoración de cambios inflamatorios en la piel de los ratones albinos, frente a radiaciones UV, se encontró que el grupo control positivo presentó valores de 2 que disminuyó hasta 1 para eritema y valores de 2 que disminuyó a 1 y 0 para edema. El grupo tratado con la crema al 1% del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote) presentó valores de 1 que disminuyó a 0 para eritema y valores de 1 que disminuyeron a

0 para edema. El grupo tratado con la crema al 3% del extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote) presento valores de 1 que disminuyó a 0 para eritema y valores de 1 que disminuyeron a 0 para edema. Y el grupo tratado con la crema al 5% con extracto etanólico al 96% de la semilla de **Bixa orellana** (achiote) presento valores de 1 que disminuyó a 0 para eritema y valores de 0 para edema.

También se evaluó la capacidad fotorreparadora in vivo mediante la valoración de cambios morfológico (hiperqueratosis, espongirosis, úlceras, congestión, anexos, costra e hiperplasia) en la piel de los ratones albinos, frente a radiaciones UV. Las alteraciones morfológicas observadas en la piel de animales de experimentación previamente depilados e irradiados, son en menor grado en los grupos tratados con la crema con el extracto etanólico de **Bixa orellana** (Achiote) al 1% mientras que los resultados con la crema patrón (Bahia Superblock) y las cremas a las concentraciones de 3% y 5% de dicho extracto presentan ligeras alteraciones en la morfología de la piel.

7. En la evaluación de Irritación Dérmica Primaria de la crema al 1% elaborada con el extracto etanólico **Bixa orellana** (achiote), se obtuvo el siguiente resultado: para la crema al 1% un IIP de 0.0 (Categoría no irritante) y para la crema base un IIP de 0.0 (Categoría no irritante)

SUGERENCIAS

A las autoridades de la Facultad de Ciencias de la Salud, recomendando lo siguiente:

- Incorporar en actividades de proyección social campañas en materia de prevención frente a los daños producidos por exposición prolongada a la radiación solar.

A los alumnos e investigadores para futuras investigaciones recomendando lo siguiente:

- Se sugiere realizar estudios de purificación de la bixina por métodos responsables con el medio ambiente
- Se sugiere la elaboración de otra forma farmacéutica como geles o lociones color piel incorporando el extracto etanólico de semillas de ***Bixa orellana*** (achiote).
- Realizar estudios de estabilidad de las formulaciones tales como fotodescomposición, fototoxicidad, fotolabilidad para así demostrar la efectividad de las mismas en un tiempo determinado.
- Realizar estudios donde se pueden combinar el extracto natural de las semillas de ***Bixa orellana*** (achiote) y otros componentes naturales, para poder obtener mayores valores de factor de protección solar (FPS) en conjunto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sordo C, Gutiérrez C. Cáncer de piel y radiación solar: experiencia peruana en la prevención y detección temprana del cáncer de piel y melanoma. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2013 Mar [cited 2019 Jan 18];30(1):113–7. Available from: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000100021&lng=es&nrm=iso&tlng=es
2. Guerra Tapia A. Indicaciones y aplicaciones de la fotoprotección. *Med* [Internet]. 2018;12(47):2811–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.med.2017.12.009>
3. Veronica B. Estudio de la actividad fotoprotectora in vitro de extractos de Aliso (*Alnus acuminata*) con distinta polaridad. Escuela Superior Politecnica de Chimborazp; 2013.
4. Gonzales M, Vernhes M, Sanchez A. La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria*, Vol 18 (2): 5-6 [Internet]. 2009 [cited 2017 Mar 22];12. Available from: http://www.ubiobio.cl/miweb/webfile/media/194/v/v18-2/THEORIA_18-2.pdf#page=69
5. Garrote A. Fotoprotección. 2008;27.
6. Duro Mota E, Campillos Páez MT, Causín Serrano S. El Sol y los Filtros Solares. *Rev Med Fam y Comunitaria*. 2003;13:159–65.
7. Rabinovich L, Kazlouskaya V. Herbal sun protection agents: Human studies. *Clin Dermatol* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2019 Jan 19];36(3):369–75. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X18300555>
8. Rogg HW. Manual: manejo integrado de plagas de cultivos de la Amazonía Ecuatoriana [Internet]. Imprenta MOSSAICO; 2001 [cited 2019 Jan 19]. 183 p. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=X-uTHzXmJloC&pg=PA110&dq=bixa+orellana+protector+solar&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj4c780vrfAhViqIkKHV3fB64Q6AEIKDAA#v=onepage&q=bixa+orellana+protector+solar&f=false>
9. Cabieses F. Apuntes de Medicina Tradicional Tomo 2. 2nd ed. Editores A, editor. Lima; 1993. 339 p.
10. Angeles Tejada M. El Secreto De Tu Belleza [Internet]. Palibrio, editor. 2013 [cited

- 2019 Jan 19]. 160 p. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=qPSiF66JDWgC&dq=bixa+orellana+piel&hl=es&source=gbs_navlinks_s
11. Moncada Jiménez J. La radiación ultravioleta y la piel del deportista. Rev la Univ Costa Rica [Internet]. 2003 [cited 2017 Mar 22];27(002):165–72. Available from: http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/32438080/Moncada_2003b.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1490192472&Signature=yNN4IOf3OF%2FgJxHnIRihYgERO%2BQ%3D&response-content-disposition=inline%3B filename%3DLa_radiacion_ultravioleta_y_la_
 12. Dedios Mimbela NJ. Radiación ultravioleta. Análisis de su comportamiento estacional en diferentes sectores de la región Piura. Costa Norte del Perú. Ing USBmed. 2016;7(1):26.
 13. Lucas R, Mcmichael T, Smith W, Editors BA, Prüss-Üstün A, Zeeb H, et al. Solar Ultraviolet Radiation Global burden of disease from solar ultraviolet radiation [Internet]. World Health Organization. Geneva; 2006 [cited 2017 Mar 22]. 258 p. Available from: http://www.who.int/uv/health/solaruvradfull_180706.pdf
 14. Azcona L. Protección solar. Farmacia Profesional Vol 17. 2003 May;6.
 15. Vernhes Tamayo M, Schuch AP, Fuentes-León F, Martins Menck CF, Sánchez-Lamar Á. Extracto acuoso de *Pinus caribaea* inhibe el daño inducido por radiaciones ultravioletas, en ADN plasmídico. J Pharm Pharmacogn Res [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 6];5(4):262–9. Available from: <http://jppres.com/jppres>
 16. Peruanos están expuestos a mayores niveles de radiación ultravioleta en este verano | LaRepublica.pe [Internet]. [cited 2019 Jan 28]. Available from: <https://larepublica.pe/reportero-ciudadano/1365088-cancer-piel-peruanos-expuestos-mayores-niveles-radiacion-ultravioleta-verano>
 17. Más de 500 peruanos mueren al año a causa de Cáncer de piel y Ley no se ejecuta | Diario Correo [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 14]. Available from: <https://diariocorreo.pe/salud/estadisticas-cancer-de-piel-peru-790644/>
 18. CANCER DE PIEL [Internet]. Liga Contra el Cáncer . 2016 [cited 2017 Mar 23]. p. 1. Available from: <http://www.ligacancer.org.pe/piel.html>
 19. Centro Nacional de Epidemiología P y C de E. Boletín Epidemiológico del Perú [Internet]. Lima: Ministerio de Salud; 2018 [cited 2019 Feb 14]. 26 p. Available

from: www.dge.gob.pe

20. Ramos W, Venegas D. Análisis de la situación del cáncer en el Perú 2013 [Internet]. Lima: Askha Eirl; 2013 [cited 2017 Mar 22]. 105 p. Available from: http://www.dge.gob.pe/portal/docs/asis_cancer.pdf
21. Casos de cáncer a la piel se incrementaron en 80% por radiación solar | RPP Noticias [Internet]. [cited 2019 Jan 28]. Available from: <https://rpp.pe/peru/cusco/casos-de-cancer-a-la-piel-se-incrementaron-en-80-por-radiacion-solar-noticia-1028915>
22. Russo JP, Ipiña A, Palazzolo JF, Cannavó AB, Piacentini RD, Niklasson B. Dermatitis fotoalérgica por contacto a protectores solares con oxibenzona en La Plata, Argentina. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2019 Feb 18];109(6):521–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001731018300917>
23. De Argila D, Aguilera J, Sánchez J, García-Díez A. Estudio de las fotodermatosis idiopáticas y exógenas. Parte II: el estudio fotobiológico. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2012;105(3):233–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2012.07.024>
24. Russo JP, Ipiña A, Palazzolo JF, Cannavó AB, Piacentini RD, Niklasson B. Dermatitis por contacto fotoalérgica a protectores solares con oxibenzona en La Plata, Argentina. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2019 Mar 5];109(6):521–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001731018300917>
25. Zaragoza-Ninet V, Blasco Encinas R, Vilata-Corell JJ, Pérez-Ferriols A, Sierra-Talamantes C, Esteve-Martínez A, et al. Dermatitis alérgica de contacto a cosméticos, estudio clínico-epidemiológico en un hospital terciario. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2016;107(4):329–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2015.12.007>
26. de la Cuadra-Oyanguren J, Pérez-Ferriols A, Lecha-Carretero M, Giménez-Arnau AM, Fernández-Redondo V, Ortiz de Frutos FJ, et al. Results and Assessment of Photopatch Testing in Spain: Towards a New Standard Set of Photoallergens. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Ed)* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2019 Mar 5];98(2):96–101. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1578219007704031>

27. De León Peguero AE. Presencia y bioacumulación de productos de cuidado personal en corales marinos de República Dominicana. 2016 Oct 24 [cited 2019 Mar 8]; Available from: <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/99979>
28. Soto M, Rodriguez G. Evaluación del efecto estrogénico por filtros UV en el pez sargento *Abudefduf saxatilis*. *Ciencias Mar.* 2014;40:187–96.
29. Cazorla M. Actividad fotoprotectora de la maracuya (*Passiflora edulis*), ishpingo (*Ocotea quixos*) en fototipos III (*Homo sapiens*) para elaboración de un protector solar. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2013.
30. García-Bores AM, Bello C, Campos Y, Benitez MC, Flores S, Canales M, Hernández T, Avila JG . Photoprotective activity of *Yucca periculosa* Polyphenols. *Boletín Latinoamericano y del Caribe Plantas Med y Aromáticas.* 2010;9(2):100–8.
31. Arce Portuguez J. Programa Mejoramiento de Cultivos Tropicales, recomendaciones para el cultivo de Achiote [Internet]. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE); 1990 [cited 2019 Jan 20]. 70 p. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=JR4OAQAAIAAJ&dq=bixa+orellana+piel&hl=es&source=gbs_navlinks_s
32. En Cusco, detectan siete casos de cáncer a la piel al mes por la radiación | *LaRepublica.pe* [Internet]. [cited 2019 Jan 29]. Available from: <https://larepublica.pe/sociedad/1013717-en-cusco-detectan-siete-casos-de-cancer-a-la-piel-al-mes-por-la-radiacion>
33. Oliveira JS De. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.) [Internet]. Universidade Federal De Santa Catarina Centro Tecnológico Departamento De Engenharia Química E Engenharia De Alimentos; 2005. Available from: [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:CARACTERIZA??O,+EXTRA??O+E+PURIFICA??O+POR+CROMATOLOGRAFIA+DE+COMPOSTOS+DE+URUCUM+\(Bixa#0](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:CARACTERIZA??O,+EXTRA??O+E+PURIFICA??O+POR+CROMATOLOGRAFIA+DE+COMPOSTOS+DE+URUCUM+(Bixa#0)
34. Jondiko IJO, Pattenden G. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. *Phytochemistry.* 1989;
35. Aldahan AS, Shah V V., Mlacker S, Nouri K. The History of Sunscreen. *JAMA Dermatology* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2018 Jun 14];151(12):1316. Available from:

- <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamadermatol.2015.3011>
36. Lim HW, Draelos D. Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection. Inc. IHU, editor. USA; 2009. 322 p.
 37. Urbach F. The historical aspects of sunscreens. J Photochem Photobiol B Biol [Internet]. 2001 Nov 15 [cited 2019 Jan 29];64(2–3):99–104. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134401002020>
 38. Violante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AFS, Santos RAN, Ferrari M. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Brazilian J Pharmacogn. 2009;19(2 A):452–7.
 39. de Souza FP, Campos GR, Packer JF. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. - Acerola. Rev Ciencias Farm Basica e Apl. 2013;34(1):69–77.
 40. de la Vega MR, Zhang DD, Wondrak GT. Topical bixin confers NRF2-dependent protection against photodamage and hair graying in mouse skin. Front Pharmacol. 2018;9(MAR):1–11.
 41. Serafini MR, Detoni CB, Menezes PDP, Pereira Filho RN, Fortes VS, Vieira MJF, et al. UVA-UVB Photoprotective Activity of Topical Formulations Containing *Morinda citrifolia* Extract. Biomed Res Int. 2014;2014.
 42. Fagundo A, Rodríguez M, González KL, Valdés O, Hernández Y, Concepción ÁR, et al. Actividad fotoprotectora y fotorreparadora de los extractos de las angiospermas marinas, *Thalassia testudinum* Banks ex König (Hydrocharitaceae) y *Syringodium filiforme* Kützinger (Cymodoceaceae). Rev Mar Cost. 2016;8(1):51–62.
 43. Molina K, Avila J. Evaluación del efecto fotoprotector de una crema a base de propóleo procedente del distrito de Lambrana-Apurimac. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; 2010.
 44. Inocente M, Tomas G. Actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una locion y gel elaborados con extracto estabilizado de camu camu (*Myrciaria dubia* Kunth.). Rev Soc Quím Perú. 2014;80:13.
 45. Inocente MC, Ch GT, Huamán JM, Palomino MP, Bonilla PR. Compuestos fenólicos , actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una crema gel

elaborada con extracto estabilizado de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* HBK). Rev Per Quím Ing Quím. 2015;17:27–34.

46. Osorio R, Moya T. Actividad fotoprotectora de formulación tópica a base del extracto hidroalcohólico de *Fragaria vesca* L. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
47. Alayo WE, Fiestas R, Ayala C, Castillo E. Desarrollo de una crema de hojas de *Piper aduncum* L . (Piperaceae) con actividad fotoprotectora in vitro. ArnaldoA. 2018;25(1):115–26.
48. Morante C, Salas N. Evaluacion de la capacidad fotoprotectora y antioxidante del extracto etanolico al 70% de la Cianobacteria *Nostoc sphaericum* Vauch (Llullucha). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2011.
49. Choque R, Durand Z. Capacidad fotoprotectora in vitro e in vivo de una crema elaborada con el extracto etanolico al 96%de la semilla de *Glycine max* “Soya.” Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2014.
50. Segura Li, Mamani A. Control de calidad fisicoquímico, microbiológico y determinación del factor de protección solar (SPF) de bloqueadores solares expendidos en los establecimientos farmacéuticos y centros comerciales del distrito de Wanchaq cusco. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco; 2015.
51. Saewan N, Jimtaisong A. Photoprotection of natural flavonoids. J Appl Pharm Sci. 2013;3(9):129–41.
52. Young AR, Claveau E, Beatris Rossi A. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. JAM ACAD DERMATOL [Internet]. 2017 [cited 2018 Jun 6];76. Available from: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(16\)30880-5/pdf](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(16)30880-5/pdf)
53. Stavros VG. Photochemistry: A bright future for sunscreens. Nat Chem [Internet]. 2014;6(11):955–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchem.2084>
54. Jungermann E. Suncreens: Regulations and commercial development. three. Shaath N, editor. United States of America: Taylor & Francis Group; 2005. 977 p.
55. Cordero J (Jesús), Boshier D, Barrance A, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza., Oxford Forestry Institute., Great Britain. Forestry Research Programme. Árboles de Centroamérica : un manual para extensionistas

- [Internet]. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza; 2003 [cited 2019 Jan 31]. 1079 p. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=q-ONAQAAlAAJ&pg=PA393&dq=hojas+de+achiote&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj a9cOIkIjgAhXMVN8KHxGmCncQ6AEILjAB#v=onepage&q=hojas de achiote&f=false>
56. Tropicos | Name - Bixa orellana var. orellana [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 31]. p. 1. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/50292861>
 57. Villar M, Villavicencio O. Manual de Fitoterapia [Internet]. OPS, Essalud, editors. Lima; 2001. 405 p. Available from: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/fitoterapia.html>
 58. Bixa orellana L. [Internet]. [cited 2018 Jul 7]. Available from: https://www.gbif.org/occurrence/gallery?taxon_key=2874863
 59. Mejia K, Rengifo E. Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonia Peruana. segunda. Uldemolis E, editor. Lima; 2000. 286 p.
 60. Arce Portuguez J. El Achiote. 51 p.
 61. Valério MA, Ramos MIL, Braga Neto JA, Macedo MLR. Annatto seed residue (Bixa orellana L.): nutritional quality. Food Sci Technol [Internet]. 2015;35(2):326–30. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612015000200326&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 62. Rivera-Madrid R, Aguilar-Espinosa M, Cárdenas-Conejo Y, Garza-Caligaris LE. Carotenoid Derivates in Achiote (Bixa orellana) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. Front Plant Sci [Internet]. 2016 Sep 21 [cited 2019 Feb 11];7:1406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27708658>
 63. Guimet R. Evaluación de la actividad Antioxidante y Determinación de polifenoles totales in vitro, de las hojas de ocho morfotipos de Bixa Orellana L. Universidad Nacional De La Amazonía Peruana; 2012.
 64. Cruz Lima RJ, De Deus Moreno AJ, Loureiro De Castro SF, Santos Gonçalves JDR, De Olivera AB, Sasaki JM, et al. Taninos hidrolisáveis em Bixa Orellana L. Quim Nova. 2006;
 65. Cardarelli CR, Benassi M de T, Mercadante AZ. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. LWT - Food Sci Technol. 2008;41(9):1689–93.

66. Da Costa CLS, Chaves MH. Extracção de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: Uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. *Quim Nova*. 2005;
67. Narvaez E, Mena C. Aislamiento y caracterización por espectroscopia visible e infrarroja del colorante del achiote (*Bixa orellana*). Quito; 2015.
68. Chisté RC, Mercadante AZ, Gomes A, Fernandes E, Lima JLFDC, Bragagnolo N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chem*. 2011;127:419–26.
69. Aher AA, Bairagi SM, Kadaskar PT, Desai SS, Nimase PK. Formulation and evaluation of herbal lipstick from colour pigments of *bixa orellana* (bixaceae) seeds. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012;4:9–11.
70. Alfaro Avalos K, Aspiros Freyre E. Desarrollo de un tinte cosmético natural a base de la semilla de *bixa orellana* (achiote) y evaluación de su efecto in vitro [Internet]. Universidad Nacional de Trujillo; 2016. Available from: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1411>
71. Cardarelli CR, Benassi M de T, Mercadante AZ. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2008;41:1689–93. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643807003532>
72. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Compendium of food additive specifications FAO JECFA Monographs [Internet]. 67 th meet. Rome; 2006. Available from: <http://www.fao.org/3/a-a0675e.pdf>
73. Rodrigues LM, Alcázar-Alay SC, Petenate AJ, Meireles MAA. Bixin extraction from defatted annatto seeds. *Comptes Rendus Chim* [Internet]. 2014;17:268–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631074813003482>
74. Taham T, Cabral FA, Barrozo MAS. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *J Supercrit Fluids* [Internet]. 2015;100:175–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.006>
75. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol*. 2006;17(6):300–12.
76. Lock Sing de Ugaz O. Colorantes naturales [Internet]. 1 ed. Pontificia Universidad

- Católica del Perú, Fondo Editorial; 1997 [cited 2017 Apr 4]. 274 p. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=LjmH_3qjaEIC&pg=PA181&lpg=PA181&dq=bixa+orellana+olga+lock&source=bl&ots=mJCQdri5qB&sig=XsQ85WyG6jcz_e_kHaY8O2GmcWYQ&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjUk5-rulvTAhUCbSYKHVmeCeYQ6AEIGDAA#v=onepage&q=bixa orellana olga lock&f=f
77. Araujo D, Suenia M. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. Hindawi. 2014;12.
 78. Germano MP, De Pasquale R, Rapisarda A, Monteleone D, Keita A, Sanogo R. Drugs used in Africa as dyes: I. Skin absorption and tolerability of *Bixa orellana* L. Phytomedicine. 1997;4(2):129–31.
 79. Paumgarten FJR, De-Carvalho RR, Araujo IB, Pinto FM, Borges OO, Souza CAM, et al. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. Food Chem Toxicol. 2002;
 80. Zegarra L, Vaisberg A, Loza C, Aguirre RL, Campos M, Fernandez I, et al. Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Study of *Bixa Orellana* in Patients with Lower Urinary Tract Symptoms Associated To Benign Prostatic Hyperplasia. *Bixa Orellana Benign Prostatic Hyperplasia Clin Urol Int Braz J Urol Int Braz J Urol* [Internet]. 2007 [cited 2017 Apr 27];33(33):493–501. Available from: http://www.brazjurol.com.br/july_august_2007/Zegarra_ing_493_501.pdf
 81. WHO. EVALUATION OF CERTAIN FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS [Internet]. Switzerland; 2004 [cited 2017 Apr 27]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42849/1/WHO_TRS_922.pdf?ua=1
 82. De los Santos C. Tendencias internacionales en fotoprotección. Tendencias en Med. 2008;3091(Cp 11600):97–102.
 83. Orozco Montero VP, Abdo S. Actividad Fotoprotectora del Taxo (*Passiflora tripartita*) y Albahaca (*Ocimum basilicum*), en fototipos III (*Homo sapiens*) para la Elaboración de un Protector [Internet]. Vol. Bachelor, Facultad de Ciencias. 2013. Available from: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2564>
 84. Wilkinson JB, Moore RJ. Cosmetología de Harry. S.A. ED de S, editor. Madrid; 1990. 1057 p.
 85. Gilaberte Y. Fotoprotección. Actas Dermosifiliogr. 2003;

86. Organización Mundial de la Salud. Índice UV solar mundial: guía práctica. Suiza; 2003. 34 p.
87. Cázares JPC, Álvarez BT, González GV, Pérez AE. Evaluación in vitro de la protección UVA de los bloqueadores solares para prescripción en México. *Gac Med Mex*. 2013;149(3):292–8.
88. Fitzpatrick.Thomas. Dermatología en Medicina General [Internet]. 7th ed. Ed. Médica Panamericana, editor. Médica Panamericana; 2009 [cited 2018 May 1]. 1200 p. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=7VUtAPt1FH0C&pg=PA57&dq=piel+estructura+y+funcion&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiZx5ef4-XaAhXSxlkKHZXDcdgQ6AEINDAD#v=onepage&q=piel+estructura+y+funcion&f=false>
89. Romero A. Anatomofisiología de la piel [Internet]. Editex, editor. 2014 [cited 2018 May 3]. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=Z8xUBQAAQBAJ&pg=PA60&dq=partes+de+la+piel&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjy3PXU4OjaAhUN3FMKHxZDcQ6AEIJjAA#v=onepage&q=62&f=false>
90. Latarjet M, Ruiz Liard A. Anatomía Humana. 2005. 1542:1554.
91. Cruz G. Cancer De Piel. Curarse En Salud [Internet]. 2007;20(4):18–20. Available from: https://www.mgc.es/downloads/PDF/setmanes/setmana_ca_200804b_02.pdf
92. Káram-Orantes M, Toussaint-Caire S, Domínguez-Cheritc J, Veja-Memije E. Características clínicas e histopatológicas del melanoma maligno en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González.” *Gac Med Mex*. 2008;144(3):219–23.
93. Sociedad Española de Oftalmología. B. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. [Internet]. Vol. 86, Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. Sociedad Española de Oftalmología; 2011 [cited 2019 Mar 8]. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-66912011000900010
94. González ZL. Percutaneous Absorption of UV Filters Contained in Sunscreen Cosmetic Products Development of Analytical Methods. University of Valencia; 2014.
95. Purim KSM, Leite N. Fotoproteção e exercício físico. *Rev Bras Med do Esporte*.

2010;16(3):224–9.

96. Velasco MVR, Balogh TS, Pedriali CA, Sarruf FD, Pinto CASO, Kaneko TM, et al. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: Avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. *Lat Am J Pharm.* 2008;27(1):23–7.
97. Cazorla M. Actividad fotoprotectora de la maracuya (*Passiflora edulis*), ishpingo (*Ocotea quixos*) en fototipos III (*Homo sapiens*) para elaboracion de un protector solar. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo; 2013.
98. Bolognia J, Schaffer J, Cerroni L. *Dermatología* [Internet]. 4th ed. Elsevier Health Sciences, editor. 2018 [cited 2019 Mar 9]. 2880 p. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=r2B5DwAAQBAJ&dq=benzofenonas&hl=es&source=gbs_navlinks_s
99. *Farmacopea de los Estados Unidos de América-USP36*. Volumen 1. 2013.
100. Edema - MedlinePlus Información de salud para usted [Internet]. National Library of Medicine; [cited 2019 Feb 19]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/edema.html>
101. Latha MS, Martis J, Shobha V, Sham Shinde R, Bangera S, Krishnankutty B, et al. Sunscreening agents: a review. *J Clin Aesthet Dermatol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Feb 19];6(1):16–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320122>
102. Roca LM, Moreira SC. Avaliação laboratorial do fator de proteção solar (FPS) em protetores utilizados por portadores de albinismo na Bahia. 2011;136–9.
103. ¿Qué es el Fotoenvejecimiento? [Internet]. [cited 2019 Feb 19]. Available from: <http://cancerdepiel.org/vida-saludable/anti-edad/fotoenvejecimiento>
104. María D, Echeverriarza P, Mercosur E, Montevideo U. Guía de uso de secadores solares para frutas, legumbres, hortalizas, plantas medicinales y carnes [Internet]. Paraguay: Fundación Celestina Perez de Almada; 2005. 42 p. Available from: <http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/FIELD/Montevideo/pdf/ED-Guiasecaderosolar.pdf>
105. Choque R, Durand D. Capacidad fotoprotectora in vitro e in vivo de una crema elaborada con el extracto etanólico al 96% de la semilla de *Glycine max* (soya). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2014.

106. Soto Vasquez M. Estudio fitoquímico de las hojas, flores y frutos de *Solanum multifidum* Lam. y *Lycianthes lycioides* (L.) Hassl. (Solanaceae) procedentes del Cerro Campana, Región La Libertad-Perú. Arnaldo [Internet]. 2014 [cited 2019 Feb 4];21(1):91–104. Available from: https://www.researchgate.net/publication/271830574_Estudio_fitoquimico_de_la_s_hojas_flores_y_frutos_de_Solanum_multifidum_Lam_y_Lycianthes_lycioides_L_Hassl_Solanaceae_procedentes_del_Cerro_Campana_Region_La_Libertad-Peru
107. Lopez Barreiro M, Garcia Hernandez A, Boucourt Rodriguez E. Toxicidad aguda tópica e irritabilidad dérmica de la decocción de hojas de *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís) Acute topical toxicity and dermal irritability of decoction of *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís). *Rev Cuba Plantas Med.* 2014;19(1):443–50.
108. OECD. Guideline for testing of chemicals. Acute Dermal Irritation / Corrosion. 2015. p. 1–8.
109. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1944;82(3).
110. Agency USEP, Assurance C. Federal Insecticide , Fungicide , and Rodenticide Act (FIFRA) Inspection Manual. 2013;(October).
111. Instituto Nacional de Salud. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón [Internet]. Lima, Perú; 2008 [cited 2018 Aug 28]. 54 p. Available from: www.ins.gob.pe
112. Mansur ODS, Breder MN, Mansur MCDA, Azulay RD. Determination of sun protection factor by spectrophotometric methods. *An Bras Dermatol* [Internet]. 1986;61(3):121–4. Available from: <http://www.anaisdedermatologia.org.br/detalhe-artigo/421/Determinacao-do-fator-de-protecao-solar-por-espectrofotometria>
113. Sayre et al. A Comparison of In vivo and In vitro Testing of Sunscreening Formulas. *Phytochem Photobiol.* 1979;29:559–66.
114. Cole CA, Davies RE, Forbes PD, D'Aloisio LC. Comparison of action spectra for acute cutaneous responses to ultraviolet radiation: man and albino hairless mouse. *Photochem Photobiol* [Internet]. 1983 Jun 1 [cited 2018 Aug 3];37(6):623–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1983.tb04531.x>

115. Devia J, Saldarriaga L. Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*). Vol. 39. 2003.
116. Rodrigues L, Alcázar-Alay S, Gomes M, Meireles A. Pressurized Liquid Extraction (PLE) of Bixin from defatted Annatto seeds. III Iberoam Conf Supercrit Fluids Cart Indias (Colombia), 2013 [Internet]. 2013;1–6. Available from: <http://www.nupeg.ufrn.br/prosciba/prosciba2013/Papers/T2-09.pdf>
117. Cruz Lima RJ, De Deus Moreno AJ, Loureiro De Castro SF, Santos Gonçalves JDR, De Olivera AB, Sasaki JM, et al. Taninos hidrolisáveis em *Bixa Orellana* L. Quim Nova. 2006;29(3):507–9.
118. Tamil Selvi A, Dinesh MG, Satyan RS, Chandrasekaran B, Rose C. Leaf and Seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. J Appl Pharm Sci. 2011;1(9):116–20.
119. Tao S, Park S, Rojo de la Vega M, Zhang D, Wondrak G. Systemic administration of the apocarotenoid bixin protects skin against solar UV-induced damage through activation of NRF2. Free Radic Biol Med. 2015;25(4):368–79.
120. Panchal C, Sapkal E, Paradkar L, Patil A, Padhiar J, Parekh P, et al. Comparison and Determination of Sun Protecting Factor (SPF) Of Some Citrus Fruit Juices. J Res Pharm Sci. 2015;6:31–4.

ANEXOS

Anexo N° 01

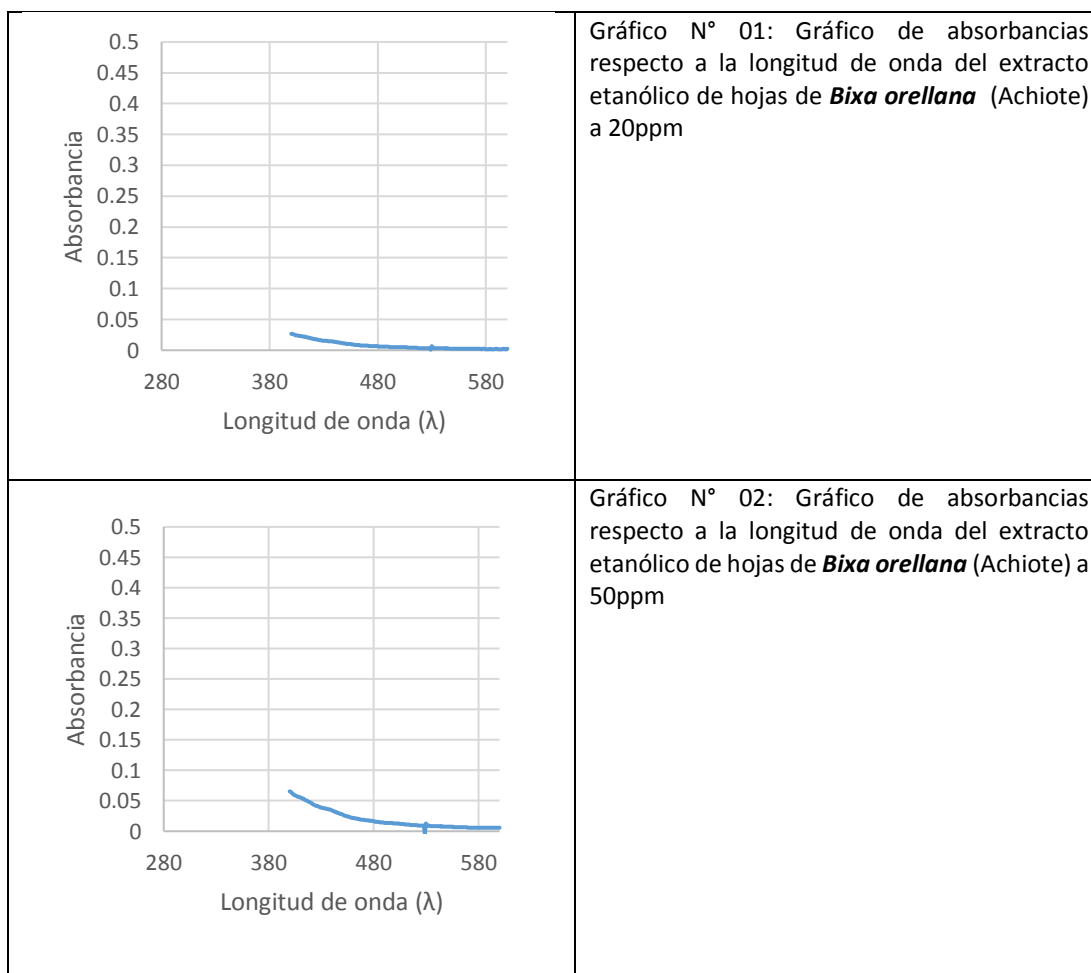
PRUEBA PILOTO

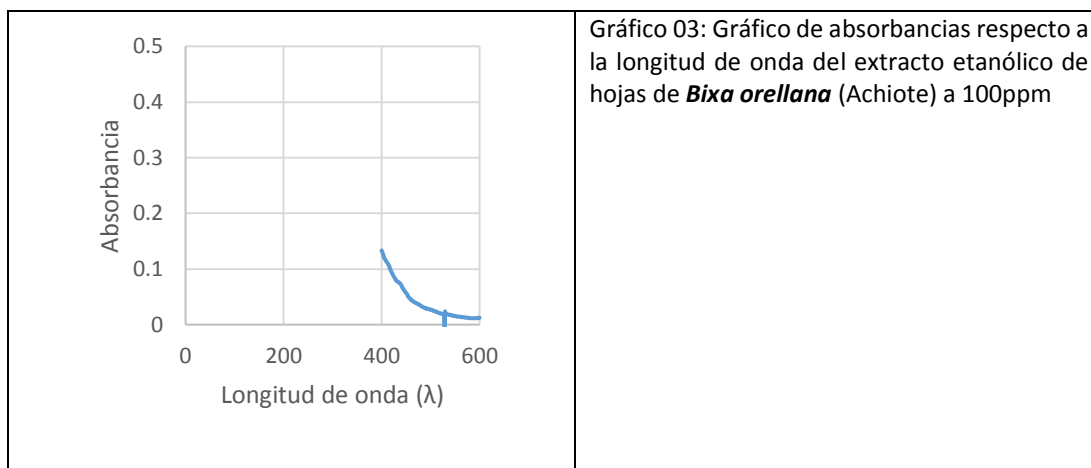
1. CALCULO DEL FPS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS O SEMILLAS DE *Bixa orellana* (ACHIOTE).

Como prueba piloto se realizo el calculo del los FPS de extractos etanólicos al 96% de las semillas y el extracto etanólico al 70% de las hojas de *Bixa orellana* (achiote). Para ello se trabajo a concentraciones de 20ppm, 50 ppm y 100 ppm concentraciones que también fueron utilizadas en estudios realizados por **I. Violante, I. Souza, C. Venturini** (38)y también **C. Panchal, E. Sapkal, L. Paradkar et al.** (120).

Hojas:

Como resultado de la lectura en el espectrofotómetro del extracto de hojas, se obtuvieron los siguientes graficos:

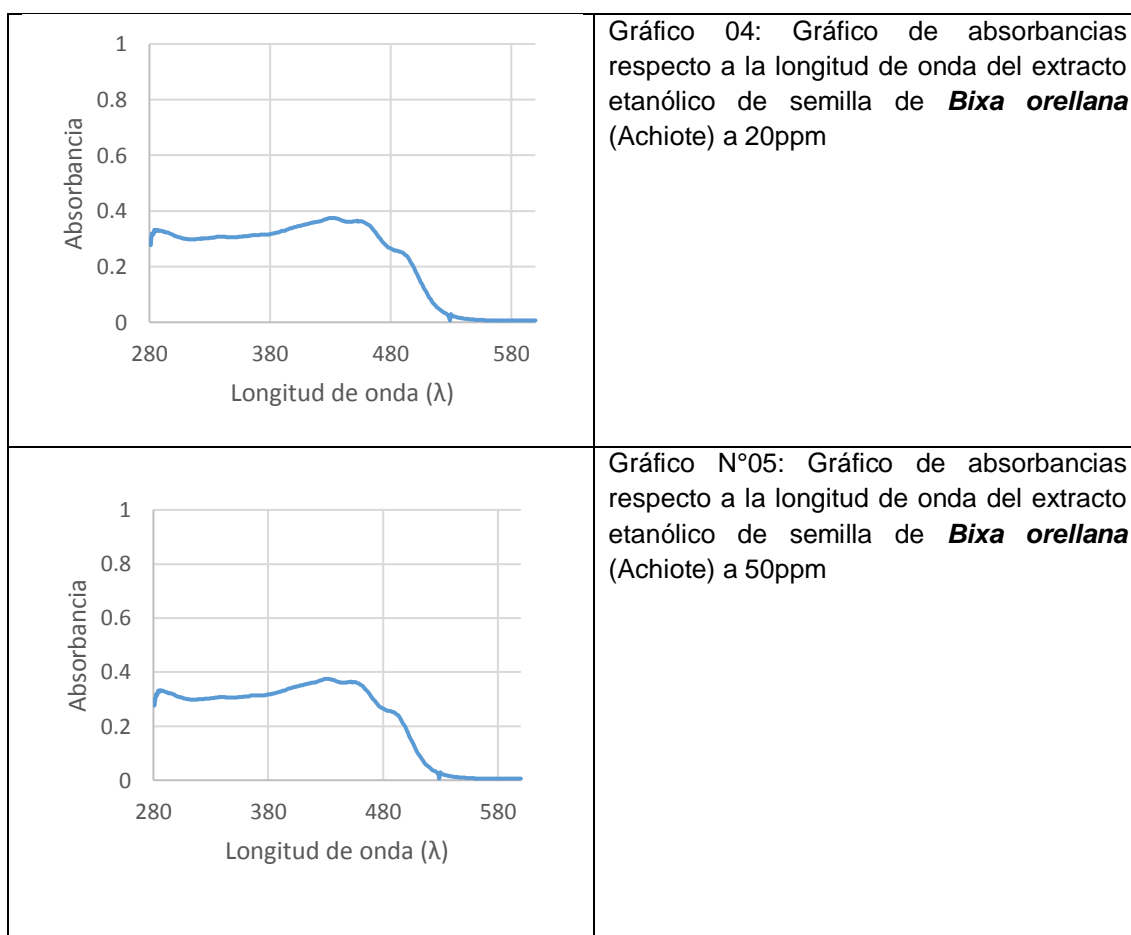


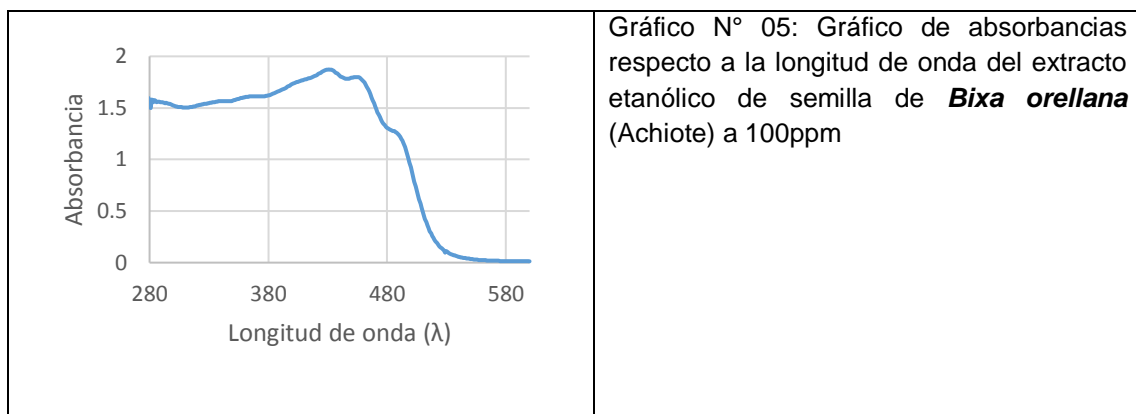


En los gráficos N° 01, 02 y 03 que muestran la relación entre la absorbancia y la longitud de onda de los diferentes extractos etanólicos de hojas de *Bixa orellana* (Achiote); se observa la ausencia de absorción entre las longitudes de onda de 280 a 320 nm, por lo que **no se puede proceder a calcular el FPS**.

Semillas

Como resultado de la lectura en el espectrofotómetro del extracto de hojas, se obtuvieron los siguientes gráficos:





En los gráficos N° 04, 05 y 06 que muestran la relación entre la absorbancia y la longitud de onda de los diferentes extractos etanólicos de semillas de **Bixa orellana** (Achiote); se observa la absorción producida entre las longitudes de onda de 280 a 320 nm, por lo que se procedió a calcular el FPS.

a) Resultados de las absorbancias de los extractos etanólicos de semilla de *Bixa orellana* (Achiote) a 20 ppm, 50 ppm y 100 ppm.

Longitud de onda λ (nm)	Absorbancias		
	20 ppm	50 ppm	100 ppm
290	0.3276	0.7628	1.5549
295	0.3221	0.7594	1.5472
300	0.3122	0.746	1.5237
305	0.3048	0.7362	1.5095
310	0.2994	0.7312	1.5039
315	0.2971	0.7308	1.5079
320	0.2998	0.7347	1.5222

Fuente: Elaboración propia

A través de la fórmula:

CÁLCULO DEL FPS

$$FPS = FC. \Sigma 320290. EE(\lambda). I(\lambda). Abs(\lambda)$$

Donde:

- FC : Factor de correlación (igual a 10) determinado en función a dos lociones fotoprotectoras de FPS conocidos, de semejante manera a una loción que contiene 8% de Homosalato de FPS igual a 4.
- EE (λ) : Efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ .
- I(λ) : Intensidad del sol en la longitud de onda λ .
- Abs (λ) : Absorbancia de la solución en la longitud de onda

b) Obtención del factor de protección solar de la crema patrón

(nm)	EExI	Absorbancias			EExIxAbs		
		20ppm	50 ppm	100ppm	20ppm	50 ppm	100ppm
290	0.015	0.3276	0.7628	1.5549	0.004914	0.011442	0.0233235
295	0.0817	0.3221	0.7594	1.5472	0.02631557	0.06204298	0.12640624
300	0.2874	0.3122	0.746	1.5237	0.08972628	0.2144004	0.43791138
305	0.3278	0.3048	0.7362	1.5095	0.09991344	0.24132636	0.4948141
310	0.1864	0.2994	0.7312	1.5039	0.05580816	0.13629568	0.28032696
315	0.0839	0.2971	0.7308	1.5079	0.02492669	0.06131412	0.12651281
320	0.018	0.2998	0.7347	1.5222	0.0053964	0.0132246	0.0273996
Sumatoria					0.30700054	0.74004614	1.51669459
X 10					3.0700054	7.4004614	15.1669459
FPS					3.0700	7.4005	15.1669

Fuente: Elaboración propia

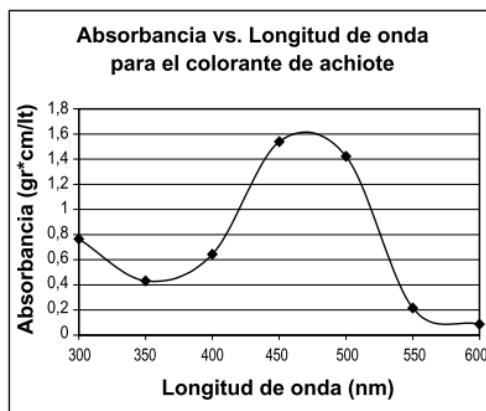
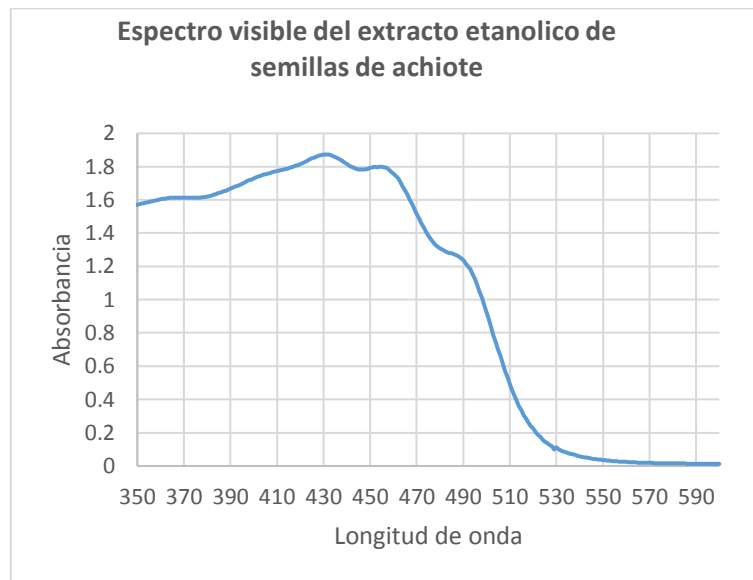
c) Resultado del Cálculo del FPS de los extractos etanólico de la semilla

Extracto etanólico de semilla	FPS calculado
20ppm	3.0700
50ppm	7.4005
100ppm	15.1669

Conclusion:

La capacidad fotoprotectora a diferentes concentraciones de los extractos etanólico de hojas y semillas que se calculó a través del método espectrofotométrico dio como resultado lo siguiente: el extracto etanólico de hojas a las concentraciones de 20 ppm, 50 ppm y 100 ppm no presento absorbancias en las longitudes 290 nm a 320 nm. En cambio el extracto etanólico de las semillas a las concentraciones de 20 ppm, 50 ppm y 100 ppm presento absorbancias en las longitudes de 290 nm a 320 nm. Por lo tanto se obtuvieron valores de FPS de 3.07, 7.4 y 15.16 para las concentraciones de 20 ppm, 50 ppm y 100 ppm respectivamente. De acuerdo a estos resultados se seleccionó el extracto etanólico de semilla de **Bixa orellana** (achiote) como objeto de estudio en los ensayos posteriores.

2. CARACTERIZACIÓN DEL COLORANTE DE *Bixa orellana* (ACHIOTE) POR ESPECTROSCOPIA UV - VIS.



Fuente: J. Devia, L. Saldarriaga

La gráfica de Absorbancia vs. Longitud de onda, deja ver claramente que la máxima absorbancia se encuentra en un rango de 430 nm a 500 nm de longitud de onda. Lo anterior se corrobora con lo encontrado en la literatura **J. Devia, L. Saldarriaga** (115), que a 480nm se presenta la mayor absorbancia para el colorante del achiote. Como se muestra la siguiente imagen:

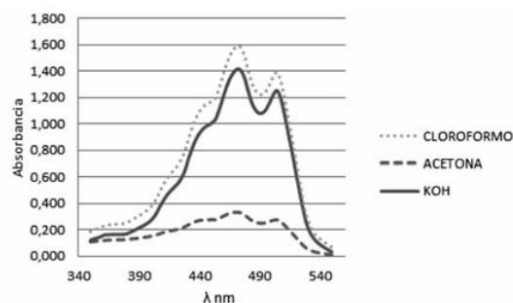


Figura 2. Espectros visibles del colorante del achiote con los diferentes solventes

Fuente: E. Narvaez, C. Mena

También se encontraron semejanzas con el estudio realizado por **E. Narvaez, C. Mena**(67) que analizaron el espectro visible de Achiote con tres diferentes solventes, como se observa en la imagen:

Anexo N° 02

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *Bixa orellana* (ACHIOTE).

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

• APARTADO POSTAL N° 921 - Cusco - Perú	• CIUDAD UNIVERSITARIA Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226	• MUSEO INKA Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
• FAX: 238156 - 238173 - 222512	• CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210 243835 - 243836 - 243837 - 243838	• CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
• RECTORADO Calle Tigre N° 127 Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398	• LOCAL CENTRAL Plaza de Armas s/n Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015	• COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA" Av. De la Cultura N° 721 "Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

EL QUE SUSCRIBE PROFESOR INVESTIGADOR ASOCIADO AL HERBARIO VARGAS

(CUZ)

C E R T I F I C A

Que la Señorita **Gaby Colque Arce**, Bachiller de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; ha presentado a la Dirección del Herbario (CUZ), un espécimen de planta herborizada para su determinación taxonómica, la que al ser diagnosticada utilizando claves dicotómicas, consultas con bibliografía especializada y comparación con muestras del Herbario, pertenece a la especie *Bixa orellana*, la misma que en concordancia con el Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group. APG III - 2009), presenta la siguiente posición taxonómica:

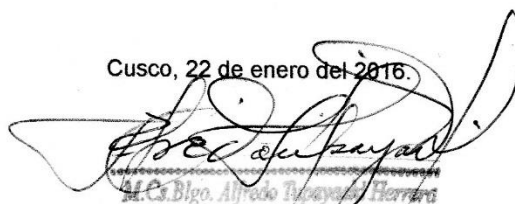
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Rosanae
Orden	Malvales
Familia	Bixaceae
Género	<i>Bixa</i>
Especie	<i>Bixa orellana</i> Linnaeus

Sinonimias: *Bixa acuminata* Bojer, *B. americana* Poir., *B. odorata* Ruiz 6 Pav. ex G. Don., *B. orellana* fo. *leiocarpa* (Kuntze) J.F. Macbr., *B. platicarpa* Ruiz & Pav. ex G. Don., *B. tinctoria* Salisb., *B. upatensis* Ram. Goyena, *B. urucurana* Willd., *Orellana americana* Kuntze, *Orellana orellana* (L.) Kuntze

Nombres comunes : Achote, Achiote. Achihuite.

Se expide la presente certificación para fines de investigación.

Cusco, 22 de enero del 2016.


M.Cs. Bgo. Alfredo Tizayaco Herrera
Prof. Investigador Asociado al Herbario Vargas (CUZ)

Anexo N° 3

CERTIFICADO SANITARIO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS
COORDINACIÓN DE BIOTERIO

CERTIFICADO SANITARIO N° 268- 2017

Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M-52-2017
Especie	: <u>Mus musculus</u>	Cantidad	: 60
Cepa	: Balb/c/CNPB	Edad	: 1 mês ½
Peso	: Mayor a 15 a 24 g.	Sexo	: hembras

Boleta de	: 035191	Destino	: Colque Arce, Gaby.
Venta.	:		

Chorrillos : 27 de diciembre del 2017

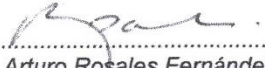
El Médico Veterinario, que suscribe, **Arturo Rosales Fernández**. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias * .

*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.

Chorrillos, 27 de diciembre del 2017

(Fecha de emisión del certificado)

NOTA: El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.


M.V. Arturo Rosales Fernández.
C.M.V.P. 1586

Anexo N° 4

CONSTANCIA DE ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

CONSTANCIA

La que suscribe, Miriam Valmi Luna Flores, Médico Anatómo Patólogo del Hospital Regional del Cusco.

Doy constancia de haber realizado el estudio histopatológico de 15 láminas de pieles de ratón pertenecientes a la tesis intitulada EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOPROTECTORA, DETERMINACIÓN DEL FPS E IRRITACIÓN PRIMARIA EN PIEL DE RATONES DE UNA CREMA ELABORADA CON EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 96% DE LAS SEMILLAS DE *Bixa orellana* (ACHIOTE) de la Bach. Gaby Colque Arce de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica.

Lo que expido para los fines convenientes.


Valmi Luna Flores
MÉDICO ANATOMO PATÓLOGO
CMP. 32411 RNE. 17836

Cusco, 31 de julio del 2018

Anexo N° 4

FICHA DE REGISTRO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

- Determinación de porcentaje de humedad

Muestra	Peso inicial (g)	Peso Final (g)	Porcentaje de humedad
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
		Promedio	

- Determinación de porcentaje de rendimiento

Muestra	Peso de muestra inicial (g)	Solvente	Peso del extracto final (g)	Rendimiento %
Muestra 1				
Muestra 2				
Muestra 3				
			Promedio	

- Análisis fitoquímico cualitativo

Metabolitos	Reactivo	Resultado	Observaciones
Carbohidrato			
Compuestos Fenólicos			
Taninos			
Flavonoides			
Antocianinas y Flavonoides			
Aminoácidos Libre de Grupos amino			
Alcaloides			
Quinonas			

- Ensayo de irritación dérmica aguda del extracto al 96% de ***Bixa orellana*** (Achiote)

		Eritema					Edema					Suma total	Total Obs (5) =	Valores de irritación Primaria	
		Tiempo (min=minutos, h=hora)													
Concentración Del extracto	Nº animal	30 Min	1 h	24	48	72	30	1	24	48	72				
1%	1												/5	=	
	2												/5	=	
	3												/5	=	
	Índice de Irritación Primaria (IIP) =														
3%	1												/5	=	
	2												/5	=	
	3												/5	=	
	Índice de Irritación Primaria (IIP) =														
5%	1												/5	=	
	2												/5	=	
	3												/5	=	
	Índice de Irritación Primaria (IIP) =														

- Análisis organoléptico de las cremas

Análisis	Formulación			
	Crema base	Crema al 1%	Crema al 3%	Crema al 5%
Aspecto				
Textura				
Consistencia				
Color				
Olor				
Ph				

- Valoración de cambios inflamatorios cutáneos

Grupo	Ratón	Eritema				Edema			
		6h	24h	48h	72h	6h	24h	48h	72h
1%	R ₁								
	R ₂								
	R ₃								
3%	R ₁								
	R ₂								
	R ₃								
5%	R ₁								
	R ₂								
	R ₃								
Control positivo	R ₁								
	R ₂								
	R ₃								
Control negativo	R ₁								
	R ₂								
	R ₃								
Patrón	R ₁								
	R ₂								
	R ₃								

- Valoración de cambios morfológicos cutáneos

Grupo	Nº Animales	Hiperqueratosis	Espongiosis	Úlceras	Congestión	Anexos	Costra
Control Positivo							
Control Negativo							
Patrón							
1%							
3%							
5%							

- Ficha para el registro de datos para calcular el factor de protección solar de las cremas elaboradas a base del extracto etanólico.

		Absorbancias			EExIxAbs		
(nm)	EExI	1	2	3	1	2	3
290							
295							
300							
305							
310							
315							
320							
		Sumatoria					

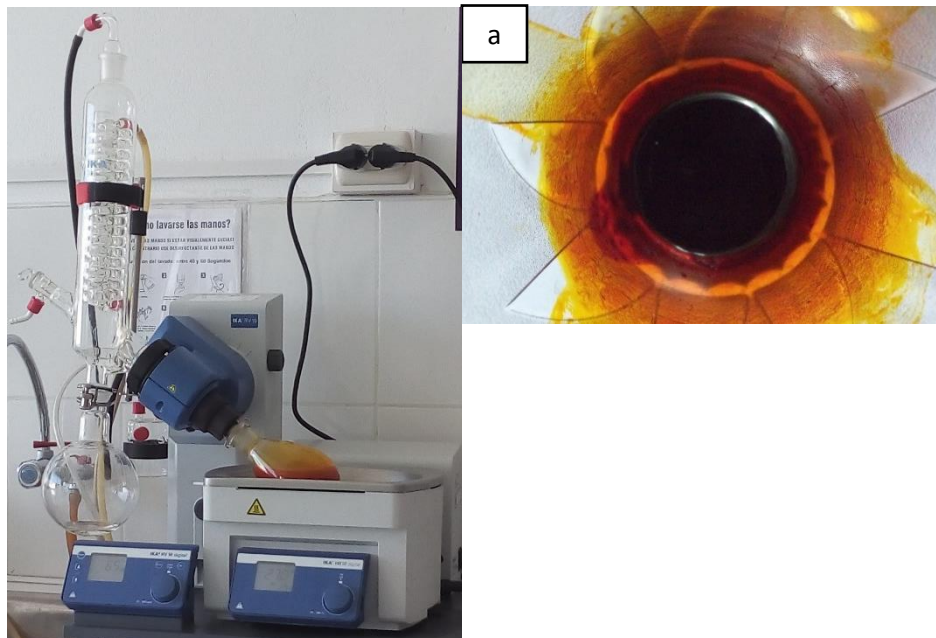
ANEXO N° 05:

GALERÍA FOTOGRÁFICA

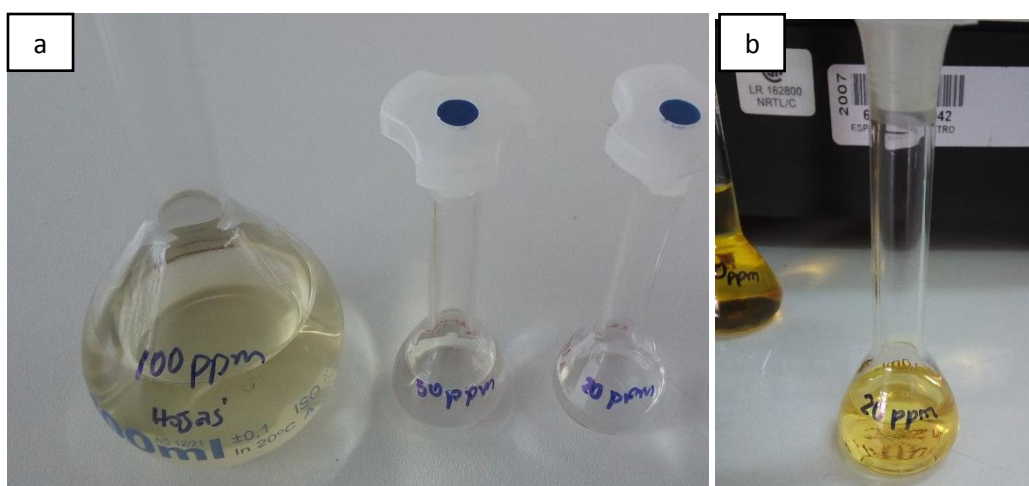
Fotografía N°01: a) Semillas de ***Bixa orellana*** (achiote)



Fotografía N° 2: Obtención de extracto seco hidroalcohólico al 96% de ***Bixa orellana*** (achiote) de semilla y hojas. a) extracto seco de semilla



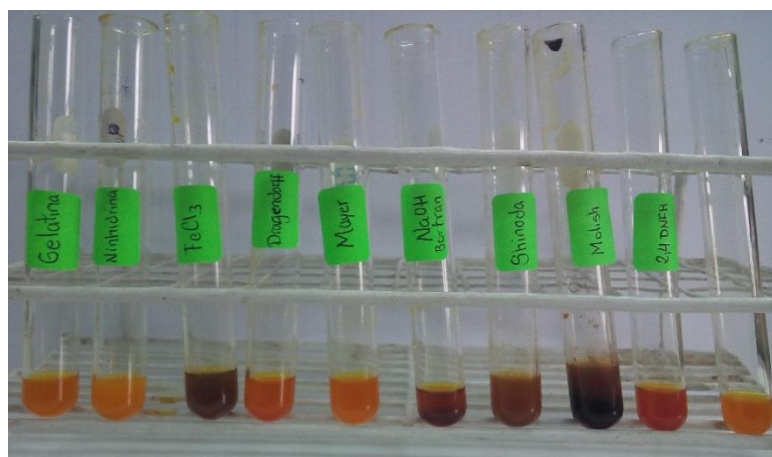
Fotografía N° 3: Lectura en espectrofotómetro de extractos de hojas y semillas. a) muestra en fiola de hojas y b) muestra en fiola de semillas



Fotografía N° 4: Muestras para prueba de porcentaje de humedad



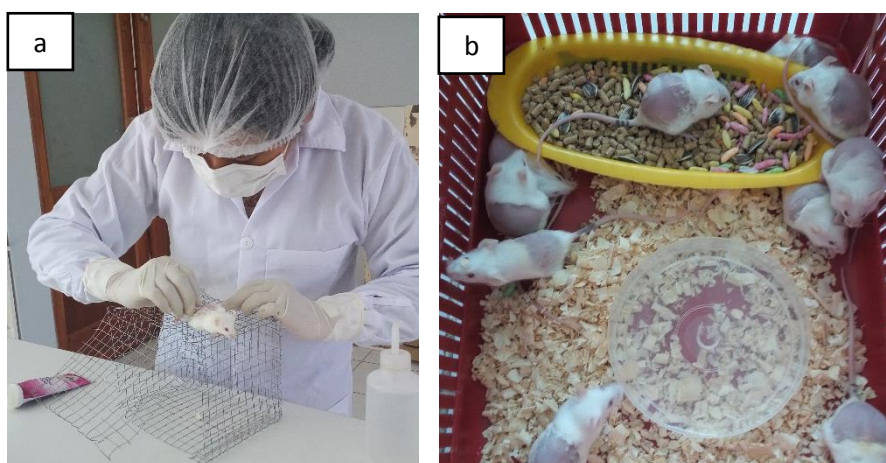
Fotografía N° 5: Resultados de marcha fitoquímica



Fotografía N° 6: Animales de experimentación



Fotografía N° 7: a) Aplicación de crema depiladora, b) ratones depilados



Fotografía N° 8: Extracto etanólico de *Bixa orellana* en Tween 80

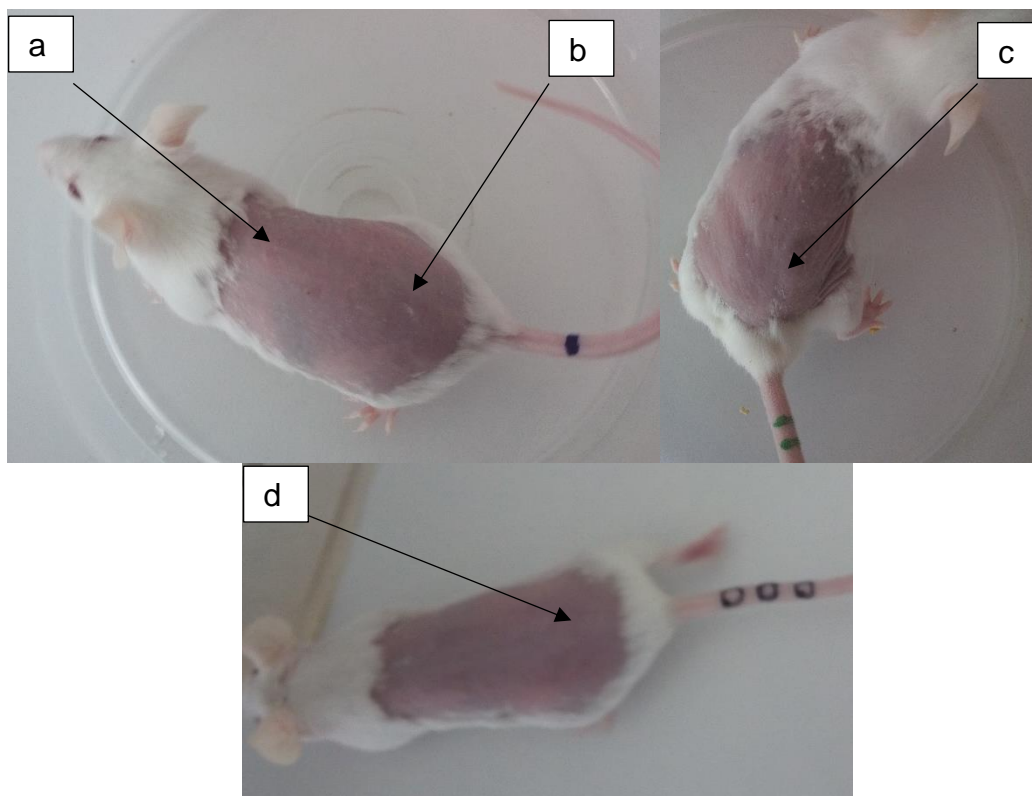


Fotografía N° 9: Ensayo de irritación dérmica de extracto diluido en Tween



Fotografía N° 10: Resultados del ensayo de irritación dérmica del extracto

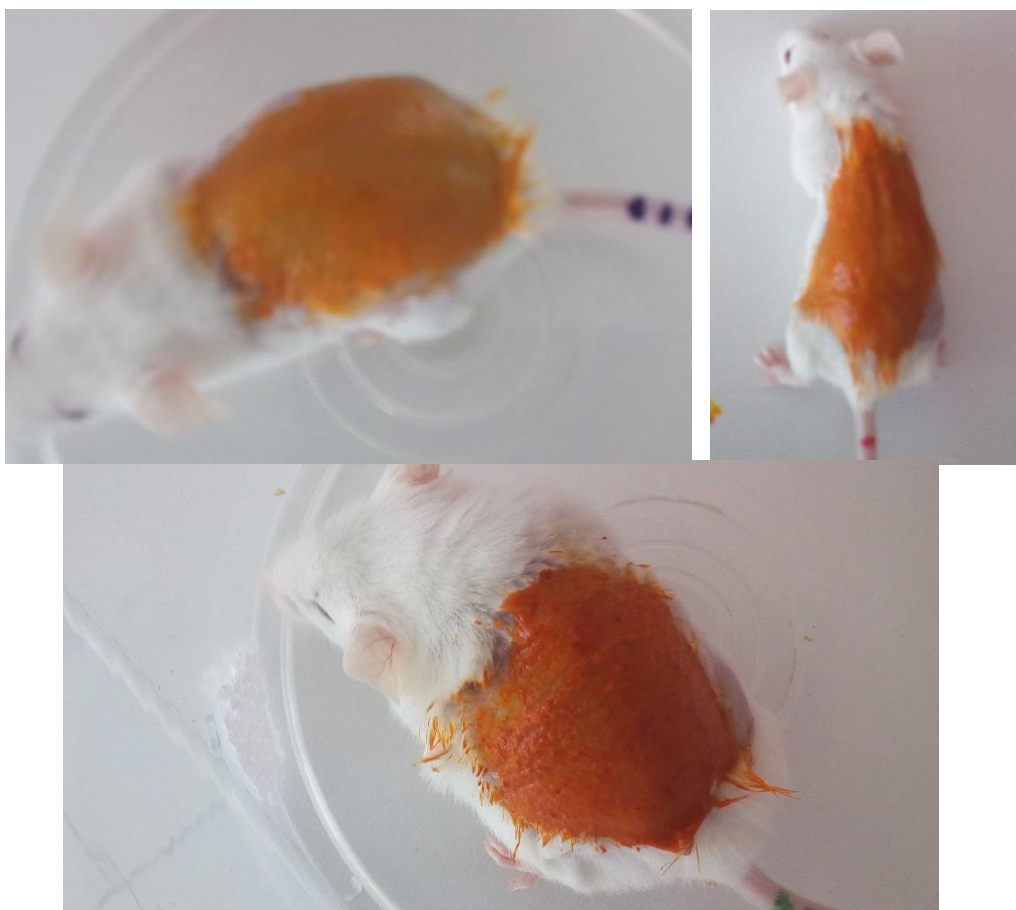
a) Control: Parte superior del ratón; b) Ratón tratado con 1% del extracto: parte inferior del lomo, no presenta ni eritema ni edema; c) Ratón tratado con 3% del extracto: no presenta eritema ni edema; d) Ratón tratado con 5% del extracto: no presenta eritema ni edema a las 24 horas del estudio.



Fotografía N° 11: a) Crema al 1% del extracto etanólico de la semilla de ***Bixa orellana*** (achiote). b) Crema al 3% del extracto etanólico de la semilla de ***Bixa orellana*** (achiote). c) Crema al 5% del extracto etanólico de la semilla de ***Bixa orellana*** (achiote).



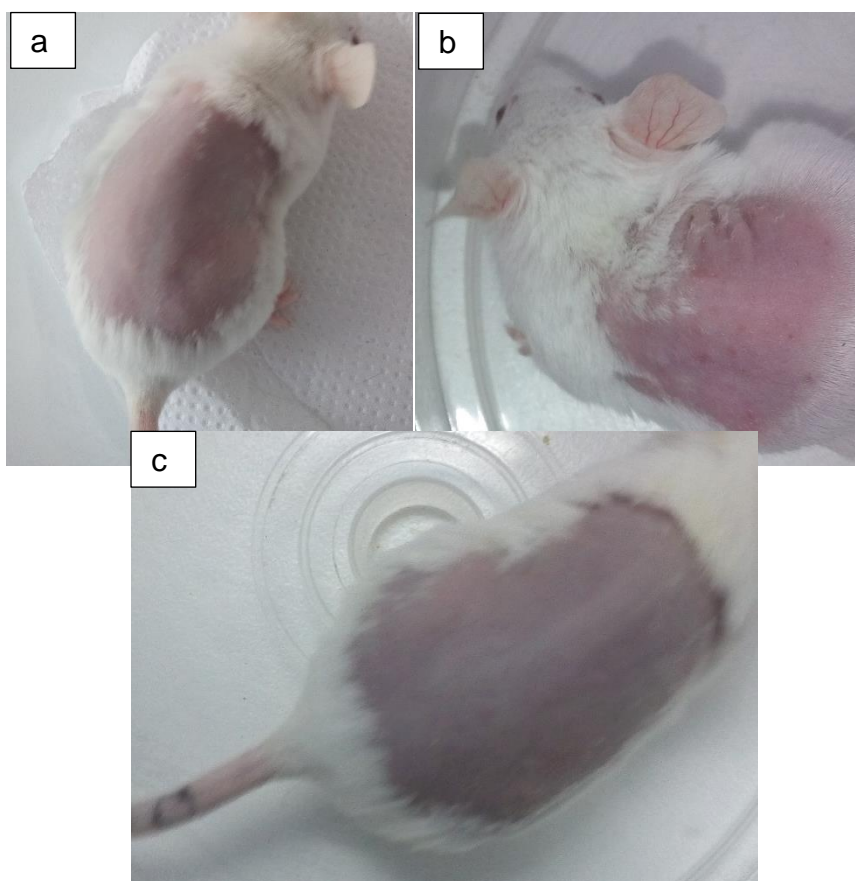
Fotografía N° 12: Aplicación en ratones de las diferentes cremas



Fotografía N° 13: Ensayo de irradiación de ratones albinos



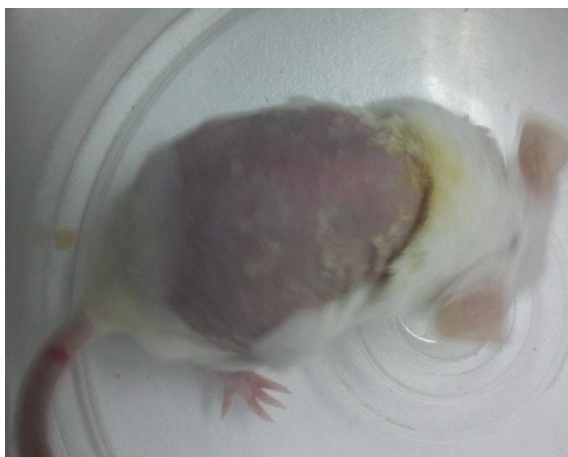
Fotografía N° 14: Cambios inflamatorios cutáneos. a) Ratón control negativo sin eritema ni edema. b) Ratón control positivo con eritema definido y edema moderado a las 24 horas. c) Ratón tratado con crema patrón sin eritema definido y sin edema.



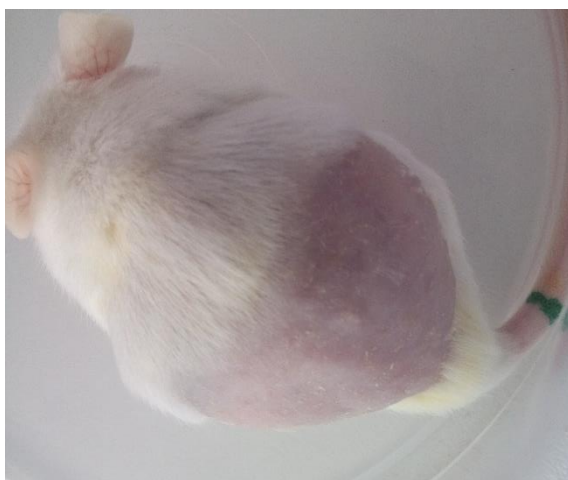
Fotografía N° 15: En el ratón tratado con la crema al 1% del extracto etanólico de **Bixa orellana** (Achiote). Se observa eritema ligero y sin edema a las 24 horas después de la irradiación.



Fotografía N° 16: Ratón tratado con la crema al 3% del extracto etanólico de **Bixa orellana** (Achiote). Se observa eritema ligero y sin edema a las 24 horas después de la irradiación.



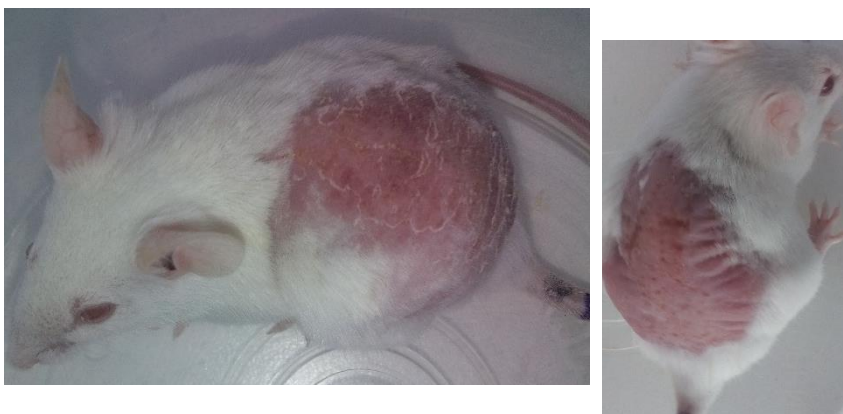
Fotografía N° 17: Ratón tratado con la crema al 5% del extracto etanólico de **Bixa orellana** (Achiote). No se aprecia ni eritema, ni edema a las 24 horas después de la irradiación.



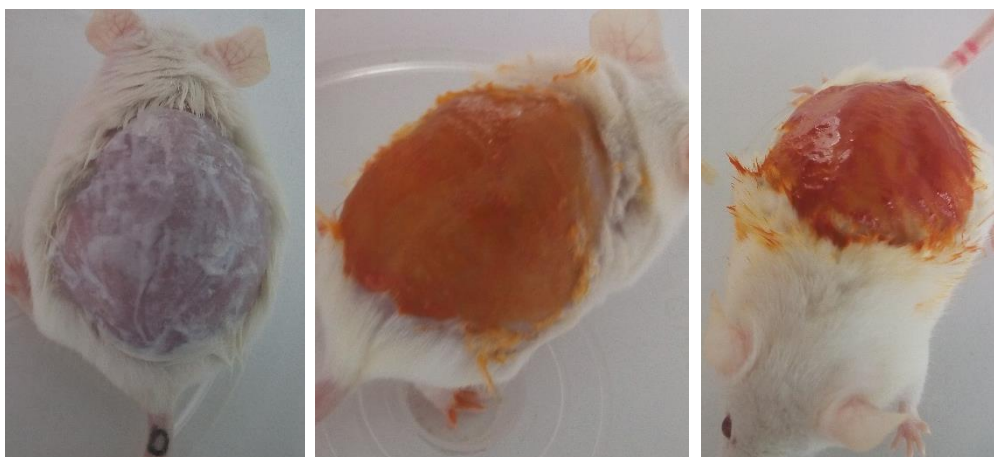
Fotografía N° 18: Irradiación con lámpara UV para ensayo de cambios morfológicos



Fotografía N° 19: Ratones irradiados sin aplicación de ningún producto para ensayo de cambios morfológicos.



Fotografía N° 20: Aplicación de cremas con extracto etanólico de ***Bixa orellana*** (Achiote) durante el proceso de tratamiento (dos veces por día por cinco días), para el ensayo de valoración de cambios morfológicos cutáneos.



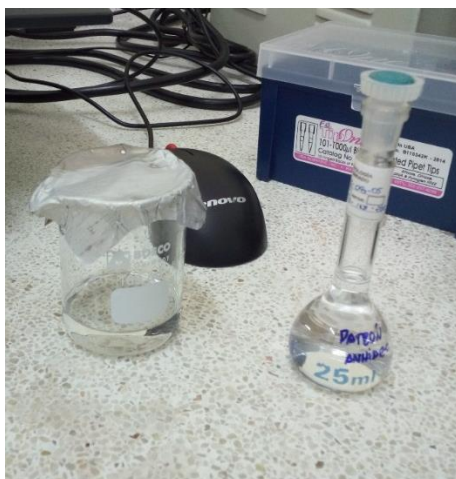
Fotografía N° 21: Tejido epidérmico de ratones para análisis histopatológico.



Fotografía N° 22: Crema patrón – producto comercial



Fotografía N° 23: Lectura en espectrofotómetro del producto comercial



Fotografía N° 24: Prueba de Irritación Dérmica (dermatotoxicidad) de crema al 1% y crema base.

